

Über die Wechselwirkungen von Untereinheiten in oligomeren Proteinen

Untersuchungen zur reversiblen Dissoziation von
Glucosedehydrogenase

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Hans-Erwin Pauly

Bochum 1976



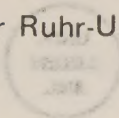
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546609_0029

Über die Wechselwirkungen von Untereinheiten in oligomeren Proteinen

Untersuchungen zur reversiblen Dissoziation von
Glucosedehydrogenase

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum



von
Hans-Erwin Pauly

Bochum 1976



INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	4
------------	---

TEIL I

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON GLUCOSEDEHYDROGENASE	8
--	---

1.	Verbesserung des Reinigungsverfahrens	9
2.	Aminosäurezusammensetzung	11
3.	UV-Spektrum und Absorptionskoeffizient	13
4.	Isoelektrischer Punkt	13
5.	Molekulargewichtsbestimmungen	14
5.1.	Gelfiltration	14
5.2.	Elektrophorese	15
5.3.	Dichtegradientenzentrifugation	16
5.4.	Dünnschichtgelchromatographie	18
6.	Kinetische Daten	20
6.1.	pH-Optimum	20
6.2.	Dissoziationskonstante des Enzym-NAD-Komplexes und Michaeliskonstanten	21

TEIL II

REVERSIBLE DISSOZIATION UND DENATURIERUNG VON GLUCOSE- DEHYDROGENASE	24
---	----

1.	Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen nativer und monomerer GlucDH	25
1.1.	Konformationsuntersuchungen	25
1.1.1.	Optische Rotationsdispersion	25
1.1.2.	UV-Differenzspektroskopie	27
1.1.3.	Fluoreszenzspektroskopie	31
1.1.3.1.	Polarisationsspektren der Eiweißfluoreszenz	32
1.1.3.2.	Bindung von 1-Anilinnaphthalin-8-sulfonsäure	33
1.1.4.	Immunologische Untersuchungen	35

1.2.	Funktionelle Unterschiede	37
1.2.1.	Enzymatische Aktivität	37
1.2.2.	Coenzymbindungsfähigkeit	38
1.3.	Korrelation zwischen Enzymaktivität und Konformationsänderungen	39
2.	Untersuchungen zum Mechanismus der Dissoziation	42
2.1.	Einfluß des pH-Wertes	42
2.1.1.	Die Reversibilität der Dissoziation	42
2.1.2.	Die Reaktionsgeschwindigkeit und das Gleichgewicht der Dissoziation	44
2.2.	Temperatureinfluß und thermodynamische Größen	50
2.3.	Bedeutung der Ionenstärke und Ionenart	53
2.4.	Bedeutung der Coenzymbindungsstelle	57
3.	Die reversible Denaturierung von GlucDH	62
4.	Diskussion und Zusammenfassung	66
MATERIAL UND METHODEN		72
Verwendete Abkürzungen		78
LITERATURVERZEICHNIS		79

Einleitung

Der überwiegende Teil der Proteine existiert in seiner biologisch aktiven Form als Oligomer aus identischen oder verschiedenen Untereinheiten. Bei den nicht-kovalenten Bindungskräften, die die Untereinheiten in der Quartärstruktur zusammenhalten, handelt es sich um die gleichen Wechselwirkungen, die auch die Aufrechterhaltung der spezifischen dreidimensionalen Struktur innerhalb einer Polypeptidkette gewährleisten. Neben polaren Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Bindungen stabilisieren van der Waals-Kräfte und hydrophobe Bindungen die durch die Aminosäuresequenz und die jeweiligen Umgebungsfaktoren (pH, Temperatur, Ionenstärke und Metaboliten) festgelegte Proteinstruktur (Anfinsen, 1968 und 1973). Hydrophobe Bindungen resultieren, wie der Name besagt, aus der Abneigung apolarer Gruppen gegenüber Wasser. Die negative Änderung der freien Energie, die mit dem Transfer von apolaren Gruppen in eine Umgebung mit niedriger Dielektrizitätskonstante verbunden ist, vermag in der Regel die elektrostatische Abstoßung von ionischen Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen oder Seifenmicellen zu kompensieren (Kauzmann, 1954). Diese Oberflächenladungen können in der Lösung enthaltene Elektrolyten spezifisch binden bzw. sie isolieren sich durch die Ausbildung von gegenpolig geladenen Ionenwolken. Dies erklärt die Abhängigkeit der Stabilität vieler Proteine vom Vorhandensein einer bestimmten Ionenstärke in gelöstem Zustand und die Fixierung von Gegenionen in Proteinkristallen (Lumry und Biltonen, 1969). Durch die räumliche Anordnung der Oberflächenladungen zueinander kann die Affinität zwischen den Bindungsstellen und bestimmten Ionen derart erhöht werden, daß sich der überwiegende Teil der Gegenionen auch in Lösung ständig der unmittelbaren Umgebung des Proteins aufhält (Tanford, 1961).

Zahlreiche Vorteile, die sich aus der Aggregation von Polypeptidketten zu oligomeren Proteinen ergeben, sind offensichtlich. Durch die Verkleinerung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche wird der Angriff von proteolytischen Enzymen erschwert. Weiterhin ermöglicht die Aggregation eine energetisch bevorzugte Trennung von im Innern des oligomeren Enzyms lokali-

sierten apolaren Aminosäuren und polaren Bereichen der Proteinoberfläche. Die größere Starrheit der Molekularstruktur, die mit der Aggregation einhergeht, führt zu einer Stabilisierung des Proteins gegenüber thermischem "Stress". Bei Enzymen bietet die oligomere Anordnung darüber hinaus zusätzliche Möglichkeiten der Regulation. Durch die Bildung von Isoenzymen, d.h. Aggregaten aus unterschiedlichen Polypeptidketten gleicher Funktion, kann eine differenzierte Abstufung der katalytischen Eigenschaften in einzelnen Teilbereichen eines Organismus erreicht werden. Auf der Beeinflussung von Nachbaruntereinheiten durch Vorgänge in einer Polypeptidkette basieren die Phänomene der allosterischen Regulation und Kooperativität von oligomeren Enzymen. Die Perfektionierung dieser Mechanismen führte zum Entstehen von Enzymaggregaten, die wie die Aspartat-Transcarbamylase spezielle regulatorische Untereinheiten für die Steuerung der benachbarten katalytischen Untereinheiten besitzen. Diese "Fernsteuerung" wird dadurch möglich, daß die durch niedermolekulare Metaboliten induzierten Konformationsänderungen in einer Polypeptidkette über die Untereinheitenkontaktregionen Veränderungen in den katalytischen Zentren der Nachbaruntereinheiten erzeugen. Ähnliche, lokal begrenzte Veränderungen der Konformation werden bei allen Proteinen unter der Einwirkung von Umgebungsfaktoren beobachtet. Da die bindenden Kräfte zwischen den Untereinheiten in der Regel schwächer sind als die Bindungen, die die dreidimensionale Struktur innerhalb einer Untereinheit aufrechterhalten, ist die Quartärstruktur am leichtesten durch solche Faktoren zu beeinflussen. Hinsichtlich der Methodik und der Interpretation bietet deshalb die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten oligomerer Proteine zahlreiche Vorteile.

In oligomeren Enzymen kommt der Beziehung zwischen Struktur und biologischer Funktion besondere Bedeutung zu. Die Frage, ob isolierte Untereinheiten oligomerer Enzyme katalytisch aktiv sein können, kann nicht generell beantwortet werden. Bei den NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen, einer der größten und wichtigsten Enzymgruppen, konnte bisher noch kein aktives Monomer nachgewiesen werden. Die Dissoziation dieser Enzyme gelang bisher nur mit Hilfe drastischer Methoden, z.B. extremer pH-Werte (Jaenicke, 1974; Vallee und Williams, 1975; Anderson und Weber, 1966), durch

Einsatz organischer Lösungsmittel (Millar, 1974) oder spezieller Denaturierungsmittel. Erschwert wurden solche Untersuchungen durch die meist begrenzte Reversibilität der Konformationsänderungen und das Auftreten von inaktiven Polymeren oder von Produktgemischen mit unterschiedlichen Denaturierungsgraden (Jaenicke, 1974; Vallee und Williams, 1975). Deshalb konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Inaktivität monomerer Dehydrogenasen auf die Dissoziationsbedingungen zurückzuführen war.

Vorversuche zeigten, daß GlucDH aus *Bacillus megaterium* bereits unter den milden Bedingungen der Disk-Gelelektrophorese in Untereinheiten zerfällt. Dieses Enzym katalysiert die Oxydation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1.5-lacton unter Verwendung von NAD bzw. NADP als Coenzym. GlucDH stellt das Leitenzym der Sporulation von *Bacilliaceae* dar, d.h. das Enzym wird während der Verkapselung des Mikroorganismus gebildet, die diesen in die Lage versetzt, auch bei widrigen äußeren Bedingungen, wie Nahrungsentzug, Trockenheit und Hitze zu überleben. Unter günstigen Lebensbedingungen vermag die Spore zu keimen und formt wieder eine vegetative Zelle. GlucDH nimmt bei diesem Vorgang eine Sonderstellung ein, da das Enzym am Anfang eines Stoffwechselweges steht, der die Energie für die bei der Keimung notwendigen Veränderungen in der Spore bereitstellt. Die Überlebensfähigkeit des Mikroorganismus ist somit unter anderem von der Stabilität der GlucDH abhängig. Abgesehen von ersten Untersuchungen der mikrobiologischen Arbeitsgruppe um Sadoff (Sadoff et al., 1965; Bach, 1963; Kools, 1964) über GlucDH aus *Bacillus cereus* ist das Enzym bisher noch nicht biochemisch und physikalisch charakterisiert worden. Die Kultivierung des Mikroorganismus, die Anreicherung des Enzyms und seine Verwendung zur quantitativen Glucosebestimmung in der Diabetesdiagnostik (Banach et al., 1975) sowie die Darstellung des reinen Enzyms (Pauly, 1974) sind kürzlich beschrieben worden. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften scheint GlucDH ein ideales Modell für das Studium der Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten und ihrer Bedeutung für die Stabilität und die Struktur sowie Funktion von Dehydrogenasen zu sein. Im ersten Teil der Arbeit werden deshalb die grundlegenden physikalischen und biochemischen Eigenschaften dieses

Enzym beschrieben, soweit diese in meiner Diplomarbeit noch nicht erfaßt wurden. Gegenstand des Teils II ist die Untersuchung der Bedingungen für die reversible Dissoziation und Denaturierung und der Wechselwirkung zwischen Quartärstruktur und biologischer Funktion.

TEIL I

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON
GLUCOSEDEHYDROGENASE

1. Verbesserung des Reinigungsverfahrens

Die Eigenart der GlucDH bei Abwesenheit bestimmter Anionen im Alkalischen leicht zu dissoziieren, bedingt die Durchführung der Reinigung des Enzyms bei pH 6,5 und hoher Ionenstärke und war die Ursache für die Schwierigkeiten bei früher angewandten Reinigungsverfahren (Pauly, 1974; Pauly und Pfeleiderer, 1975). Wie Tabelle 1 zeigt, ergibt das im Methodenteil beschriebene neue Verfahren, das die ungewöhnlichen Eigenschaften des Enzyms berücksichtigt, bereits beim ersten Chromatographieschritt einen hohen Reinigungsfaktor und eine Ausbeute von 83 Prozent. Zum anderen wird die Reinigung dadurch vereinfacht und verkürzt, daß das GlucDH-haltige Eluat des ersten Reinigungsschritts direkt auf die zweite Säule aufgetragen werden kann. Dies wurde möglich durch den Verzicht auf EDTA im Elutionspuffer, die Vertauschung der Reihenfolge der Chromatographieschritte und die Abänderung des Gradienten der QAE-Chromatographie. Die spezifische Aktivität des auf diese Weise erhaltenen reinsten Enzyms beträgt 600 U/mg Protein.

Tabelle 1 Reinigung von GlucDH
2 g Ausgangsmaterial wurden eingesetzt

Schritt	Volumen ml	Akt. U/ml	Gesamtkat. U	Protein mg/ml	Gesamtprotein mg	Spez. Aktivität U/mg Prot.	Ausbeute %	Reinigung
Ausgangsmaterial ¹⁾	100	204	20400	5	500	41	100	1
QAE-Sephadex Chromatogr.	88	223	19620	0,44	38,7	507	96	12,4
Hydrosylapert ²⁾ Chromatogr.	7	2400	16800	4,0	27,8	609	83	14,9

¹⁾ Rohprodukt, überlassen von der Firma E. Merck

Reine GlucDH behält bei hoher Eiweißkonzentration (3-10 mg/ml) in 67 mM PP pH 6,5 und 3 M NaCl mindestens vier Monate ihre volle spezifische Aktivität und das elektrophoretische Verhalten ist unverändert. Das Fällen des Enzyms mit Ammoniumsulfat führt zu einem amorphen Niederschlag unter Aktivitätsabnahme. In Lösungen geringer Ionenstärke tritt Inaktivierung ein unter Bildung von Aggregaten, die durch die Erhöhung der Ionenstärke unter teilweiser Rückgewinnung der Aktivität aufgespalten werden können.

Die Homogenität des Reinenzyms wurde mittels SDS-Elektrophorese und Isoelektrischer Fokussierung nach Vorbehandlung mit 4 M Harnstoff überprüft (Abb. 1 und 2c). In der Disk-Elektrophorese, dem üblichen Reinheitstest, zeigt GlucDH drei enzymatisch anfärbbare Banden, die mit der Proteinfärbung übereinstimmen (Abb. 3). Hierbei handelt es sich - wie später nachgewiesen wird - um native tetramere GlucDH und zwei monomere Formen, die unter den Bedingungen der Elektrophorese entstehen.



Abb. 1: SDS-Gelelektrophorese von 60 µg GlucDH in 20 % Polyacrylamidgel mit 0,1 % SDS

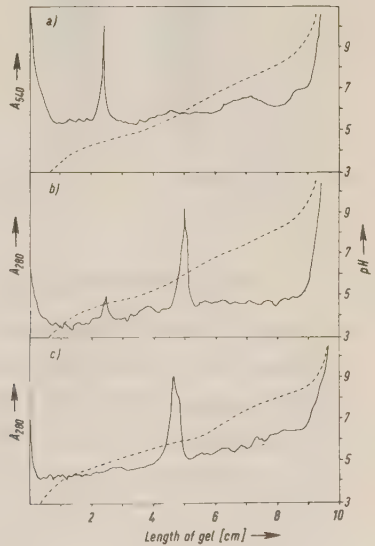


Abb. 2: Isoelektrische Fokussierung von 80 µg GlucDH im pH-Bereich von 3,5-10

- a) Densitogramm bei 540 nm nach der enzymespezifischen Anfärbung
- b) Densitogramm des nativen Enzyms bei 280 nm
- c) Densitogramm des Enzyms nach der Denaturierung in 8 M Harnstoff bei 280 nm

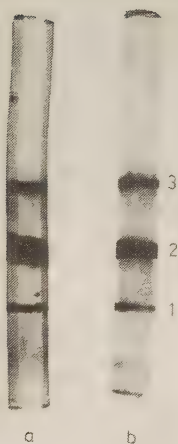


Abb. 3: Disk-Elektrophorese
von 100 μ g GlucDH
a) Spezifische Anfärbung
b) Proteinfärbung

2. Aminosäurezusammensetzung

In Tab. 2 ist die Aminosäurezusammensetzung nativer GlucDH aufgeführt. Diesen Daten sind die Werte gegenübergestellt, die für die in der Disk-Elektrophorese auftretenden drei Banden nach einem von Houston (1971) ausgearbeiteten Verfahren gefunden wurden. Hierzu wurden die mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbten und dann ausgeschnittenen Banden direkt der Hydrolyse in 6 N HCl unterworfen und nach Abtrennung der Polyacrylsäure analysiert. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen dieser Methode kann angenommen werden, daß alle in der Disk-Elektrophorese auftretenden Formen der GlucDH eine sowohl untereinander als auch mit dem nativen Enzym übereinstimmende Aminosäurezusammensetzung aufweisen. Einschränkung muß festgestellt werden, daß bei keiner Analyse der Gehalt an Amidgruppen in den Glutamin- und Asparaginsäureresten der GlucDH bestimmt werden konnte.

Tabelle 2. Aminosäurezusammensetzung von GlucDH

Aminosäure	Reste/		Molarer Anteil in Prozent			
	30000 g		Natives Enzym	Multiple Formen der Disk-Elektrophores		
				Bande 3	Bande 2	Bande 1
Asp	27,3	(27)	10,4	10,8	10,8	10,8
Thr	14,6	(15)	3,9	3,6	3,7	3,6
Ser	18,9	(19)	5,5	5,7	5,6	5,6
Glu	30,8	(31)	13,4	14,0	14,0	14,0
Pro	11,2	(11)	3,6	3,6	3,4	3,3
Gly	24,8	(25)	4,8	5,2	4,9	5,6
Ala	26,2	(26)	6,2	6,5	6,3	6,2
Val	23,1	(23)	7,6	7,1	7,5	7,4
Met	9,9	(10)	4,3	4,0	4,4	4,4
Ile	18,8	(19)	7,2	7,3	7,3	7,4
Leu	17,0	(17)	6,4	6,1	6,5	6,1
Tyr	8,8	(9)	4,9	4,9	4,9	4,9
Phe	9,4	(9)	4,4	4,6	4,3	4,4
His	4,1	(4)	1,9	2,0	1,7	1,7
Lys	18,7	(19)	8,2	8,2	8,1	8,2
Arg	7,1	(7)	3,7	n.b.	3,6	3,6
Trp	3,1	(3)	2,5	n.b.	n.b.	n.b.
Cys/2	0	(0)	0	n.b.	n.b.	n.b.

3. UV-Spektrum und Absorptionskoeffizient

Das UV-Spektrum von GlucDH in 33 mM PP pH 6,5 und 0,2 M NaCl besitzt, abgesehen von einer charakteristischen Schulter bei 282-284 nm, die sich im Laufe der Anreicherung stärker ausprägt, einen normalen Verlauf mit einem Maximum bei 278 nm und einem Minimum bei 253 nm (Abb. 4). Weiterhin ist die Tryptophanschulter bei 292 nm und eine kleinere Schulter im Bereich von 268-270 nm zu erkennen. Das Verhältnis A_{280}/A_{260} ist 2,04. Als Absorptionskoeffizient bei 280 nm wurde ein Mittelwert von $170 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ errechnet, der einer Absorption $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ von 14,2 entspricht.

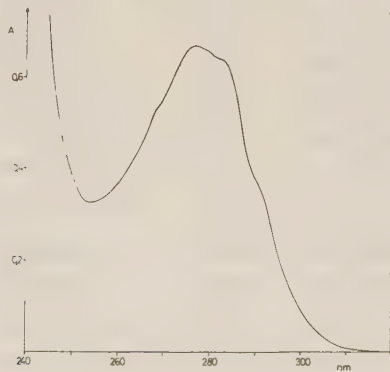


Abb. 4: UV-Spektrum von 0,48 mg/ml GlucDH in 33 mM PP pH 6,5 und 0,2 M NaCl bei 25°C

4. Isoelektrischer Punkt

Die Bestimmung des Isoelektrischen Punktes bereitete aus den gleichen Gründen Schwierigkeiten, die auch schon bei der Disk-Elektrophorese diskutiert wurden. GlucDH zerfällt unter den Bedingungen der Fokussierung weitgehend in eine inaktive Form, die einen Isoelektrischen Punkt von $5,7 \pm 0,3$ besitzt. Natives Enzym tritt nur in Spuren mit einem IP von $4,7 \pm 0,2$ auf (Abb. 1). Diese Zunahme von negativen Ladungen beim inaktiven Enzym deutet auf eine ebenso große Anzahl von Deprotonierungen bzw. von abdissoziierten positiven Gegenionen hin, die am Inaktivierungsvorgang beteiligt sind. Einzelheiten werden in Teil II. 2. diskutiert.

5. Molekulargewichtsbestimmungen

Von der Bestimmung des Molekulargewichts der GlucDH unter verschiedenen Bedingungen konnten Erkenntnisse darüber erwartet werden, welche Molekulförmlichkeiten beim vermuteten Zerfall der GlucDH zu Untereinheiten auftreten.

Folgende Methoden wurden zur Bestimmung verwendet.

5.1. Gelfiltration

Native GlucDH zeigt in der Gelfiltration bei pH 6,5 auf Sephadex G-200 ein Molekulargewicht von 116 000. Da das verwendete Säulenmaterial ein Dextranderivat darstellt und spezifische Wechselwirkungen mit einem Glucose umsetzenden Enzym nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde die Molekulargewichtsbestimmung mit dem auf Polyacrylamid-Basis hergestellten Biogel P-300 wiederholt. Dabei konnte der oben angegebene Wert von etwa 116 000 bestätigt werden (Abb. 5).

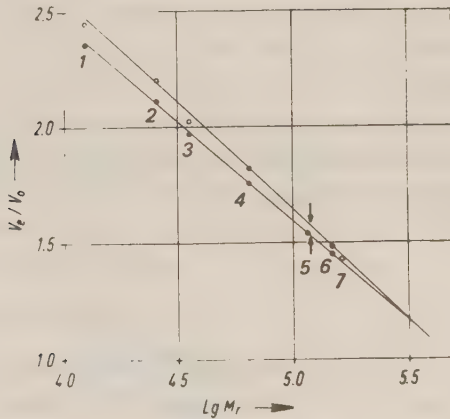


Abb. 5: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration auf Sephadex G-200 (o—o) und Biogel P-300 (•—•). Logarithmische Auftragung des Molekulargewichts M_r von Referenzproteinen gegen V_e/V_0 . Referenzproteine: (1) Cytochrom c, (2) Chymotrypsinogen, (3) Ovalbumin, (4) Rinder-serumalbumin, (5) Aldolase, (6) Menschliches γ -Globulin, (7) Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Durch SDS-Elektrophorese war für die einzelnen Polypeptidketten der GlucDH ein Molekulargewicht von 30 000 bestimmt worden (Pauly, 1974). In Verbindung mit den Ergebnissen der Isoelektrischen Fokussierung, in der nach einer Vorinkubation in 4 M Harnstoff nur eine einheitliche Enzymform auftrat, läßt das Resultat der Gelfiltration darauf schließen, daß GlucDH im nativen Zustand ein aus vier Untereinheiten gleicher Größe und Ladung aufgebautes Oligomer darstellt. Nur diese Molekülform ist bei pH 6,5 und der angegebenen Ionenstärke und Eiweißkonzentration nachzuweisen.

5.2. Elektrophorese

Die Methode von Hedrick und Smith (1968) erlaubt eine direkte elektrophoretische Bestimmung des Molekulargewichts der verschiedenen Formen, die in der Disk-Elektrophorese auftreten. Proben des Enzyms wurden in Gelen verschiedener Acrylamidkonzentration, aber gleichen Vernetzungsgrads aufgetrennt und die Mobilität R_m jeder Bande relativ zur durch Bromphenolblau markierten Lauffront gemessen (Abb. 6a). Da der Logarithmus der Mobilität R_m direkt proportional der Acrylamidkonzentration ist und eine lineare Beziehung zwischen diesem Proportionalitätsfaktor, d.h. dem Anstieg der Auftragung R_m gegen Acrylamidkonzentration und dem Molekulargewicht besteht, kann mit Hilfe von Referenzproteinen das Molekulargewicht jeder elektrophoretischen Bande bestimmt werden.

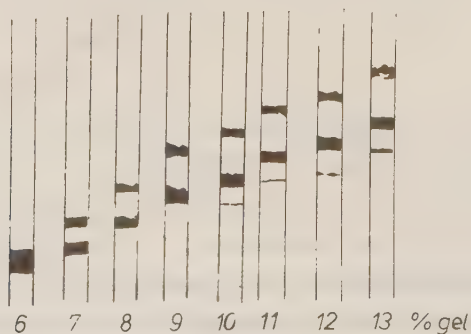


Abb. 6a: Elektrophoretische Mobilität von jeweils 60 μ g GlucDH in Acrylamidgelen steigender Konzentration

Die Ergebnisse von vier verschiedenen Bestimmungen sind in Abb. 6b zusammengestellt. Als Mittelwert wurde für die langsamste Bande ein Molekulargewicht von $120\ 000 \pm 8000$ und für die beiden schnelleren Banden $30\ 000 \pm 2000$ gefunden. Da die Aminosäurezusammensetzung der beiden monomeren Formen der GlucDH übereinstimmt, stellt die schneller wandernde Form wahrscheinlich ein Artefakt dar, das in geringen Mengen während der Elektrophorese entsteht. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung unterstützt, daß in Gelen niedriger Acrylamidkonzentration Bande 1 nicht auftritt (Abb. 6a).

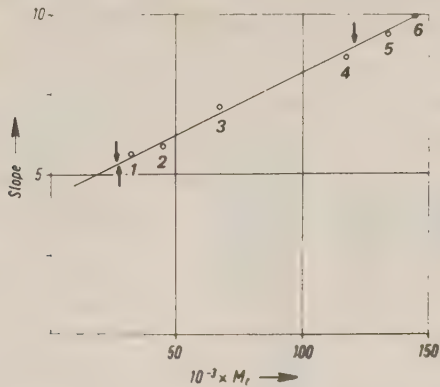


Abb. 6b: Molekulargewichtsbestimmung durch Disk-Gelelektrophorese ohne SDS
Referenzproteine: (1) Pepsin, (2) Ovalbumin, (3) monomeres Rinderserumalbumin,
(4) Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Hefe, (5) dimeres Rinderserum-
albumin, (6) LDH-H₄ aus Schwein

5.3. Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden die durch Gelfiltration und Elektrophorese erhaltenen Ergebnisse überprüft. Die Methode von Martin und Ames (1961) ergab unter Verwendung von menschlichem Hämoglobin und mit 2,4-Dinitrofluorbenzol markiertem Serumalbumin als Referenzsubstanzen einen Wert von 118 000 in 67 mM PP pH 6,5 und 0,5 M NaCl. GlucDH wurde stets in einem homogenen Peak mit mehr als 90 Prozent der aufgetragenen Aktivität wiedergefunden.

Die Ergebnisse der Experimente, die nach der abgewandelten Methode von Cole und Brooks (1968) durchgeführt wurden, sind in Abb. 7 dargestellt. Die Abbildung zeigt die nach der Zentrifugation photopolymerisierten und enzym-spezifisch angefärbten Gradienten. Variiert man die Pufferlösungen des Gradienten über einen Bereich von pH 6,5 bis 9,5, tritt in zunehmendem Maße GlucDH-Aktivität in einer Sedimentationsbande auf, die einem Molekulargewicht von etwa 26 000 entspricht. Ab pH 8 läßt sich nur noch diese Form nachweisen. Die Proteinanfärbung entspricht qualitativ ebenfalls der in Abb. 7 gezeigten enzymatischen Anfärbung.

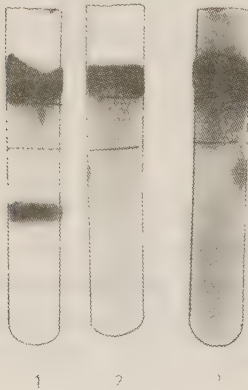


Abb. 7: Dichtegradienten-zentrifugation nach Cole und Brooks (1968)

Zentrifugation von 60 μ g GlucDH in Gradienten mit unterschiedlichen pH-Werten.

1: 33 mM PP pH 6,5 und 0,1 M NaCl;

2: 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 und 50 mM NaCl;

3: 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9,0 und 50 mM NaCl

5.4. Dünnschichtgelchromatographie

Eine deutliche Demonstration des pH-Einflusses gelang ebenfalls mit der Dünnschichtgelchromatographie, die sich auch für den schnellen Nachweis von Untereinheiten bestens bewährte. In einer ähnlichen Apparatur - wie sie von Jaworek (1969) beschrieben worden ist - konnten mit einer speziellen Abdeckung zur Verhinderung der Verdunstung Molekulargewichtsbestimmungen innerhalb von 1,5 Stunden erzielt werden. Diese Methode gestattet auf einfache Weise die Veränderung der Trennbedingungen. Die an Sephadex G-200 superfine gefundene pH-Abhängigkeit des Molekulargewichts der GlucDH ist in Abb. 8 dargestellt. Das Auftreten tetramerer GlucDH bei pH 8,0 im Gegensatz zur Dichtegradientenzentrifugation ist wohl darin begründet, daß mit der Polymerisation verbundene Aktivitätsverluste bei der letztgenannten Methode den enzymatischen Nachweis erschweren. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache zeigen beide Methoden das gleiche Resultat.

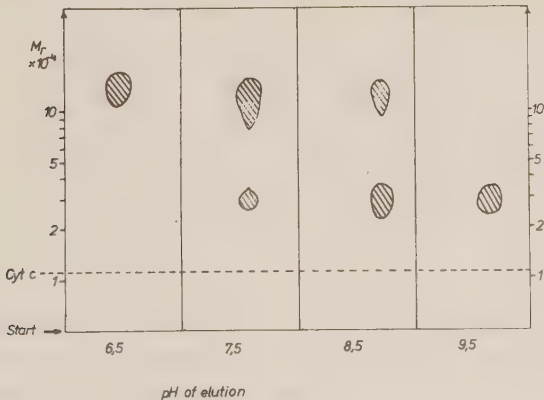


Abb. 8: Dünnschichtgelchromatographie

Elutionspuffer: 33 mM PP pH 6,5 und 0,1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 bzw. pH 8,5 und 50 mM NaCl; 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9,5 und 50 mM NaCl.

Proben: 5 μ l einer GlucDH-Lösung (1 mg/ml), die 20 Minuten vor der Auftragung der Proben durch Verdünnen einer Lösung von 4 mg/ml GlucDH im jeweiligen Elutionspuffer hergestellt wurde.

Offensichtlich ist ein Zerfall der tetrameren GlucDH im Alkalischen begünstigt und als Zerfallsprodukt bildet sich eine enzymatisch anfärbbare Form der GlucDH, deren Molekulargewicht annähernd dem für die einzelne Polypeptidkette und für die beiden schneller wandernden Anteile in der Disk-Elektrophorese gefundenen Wert entspricht. Die in der Disk-Elektrophorese zu beobachtende Dissoziation des Enzyms zu Untereinheiten läßt sich daher auf den pH-Wert dieser Methode zurückführen.

Weitere Zentrifugationsexperimente zeigten jedoch, daß die native tetramere Form des Enzyms auch im Alkalischen dominiert, wenn das Ionenmilieu bestimmte Voraussetzungen erfüllt. In Anwesenheit von 3 M NaCl wird beispielsweise selbst bei pH 11 nach einer zwanzigstündigen Zentrifugation nur tetramere GlucDH gefunden. Die komplexen Kriterien, die für die Dissoziation entscheidend sind, bilden den Gegenstand der im Teil II der Arbeit beschriebenen Untersuchungen.

6. Kinetische Daten

6.1. pH-Optimum

Frühere Messungen des pH- und Ionenstärkeinflusses zeigten vergleichbare Effekte dieser Größen auf die katalytische Funktion des Enzyms, wie sie auch hinsichtlich der Molekülgröße zu beobachten sind (Pauly, 1974). Die Bestimmung des pH-Optimums wurde deshalb in einem anderen Puffersystem und bei höherer Ionenstärke wiederholt. Das Ergebnis ist in Abb. 9 zusammen mit der früheren Messung dargestellt. Es drängt sich die Schlußfolgerung auf, daß die steile Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit im Alkalischen in der abhängig vom Ionenmilieu auftretenden Dissoziation der GlucDH begründet ist.

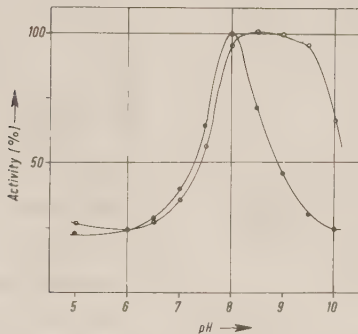


Abb. 9: pH-Optimum von GlucDH in 100 mM Citrat-NaOH Puffer pH 5-6,5 und 100 mM Tris-HCl Puffer pH 6,5-10 (●—●) und in Acetat-Borat Puffer nach Michaelis (1931) (○—○).

6.2. Dissoziationskonstante des Enzym-NAD-Komplexes und Michaelis-konstanten

Die Gleichung nach Cleland (1963) für die Anfangsgeschwindigkeit v der Hinreaktion eines zwei Substrate A und B umsetzenden Enzyms in Abwesenheit der Produkte lautet:

$$v = \frac{V \cdot [A] \cdot [B]}{K_{ia} \cdot K_b + K_b \cdot [A] \cdot [B] + K_a \cdot [B] + [A] \cdot [B]}$$

Die Ermittlung der kinetischen Koeffizienten erfolgt durch Variation der Substratkonzentration A für jede Konzentration von B und die in den Abb. 10 und 11 dargestellte Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten.

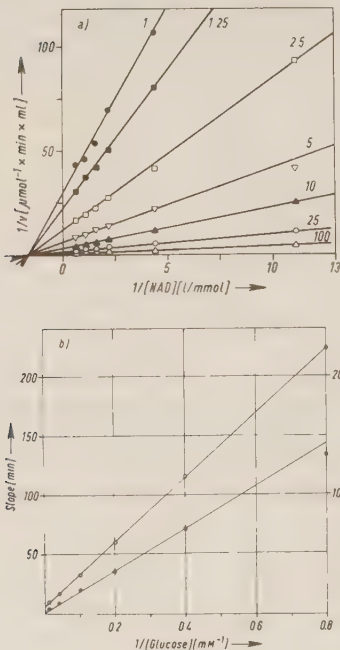


Abb. 10: a) Änderung der reziproken Anfangsgeschwindigkeit v der enzymatischen Umsetzung in Acetat-Borat Puffer pH 9 und bei 25°C in Abhängigkeit von der reziproken NAD-Konzentration für verschiedene konstante Glucosekonzentrationen (Angabe in mM neben den Linien)

b) Änderung der Achsenabschnitte (o—o) und der Anstiege (●—●) der doppelt reziproken Auftragung in a) in Abhängigkeit von der reziproken Glucosekonzentration

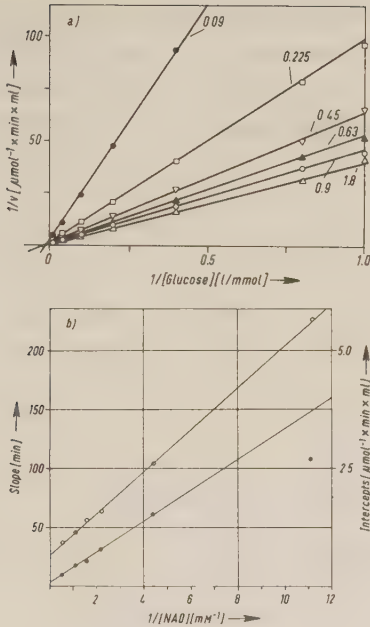


Abb. 11: a) Änderung der reziproken Anfangsgeschwindigkeit v der enzymatischen Umsetzung in Acetat-Borat Puffer pH 9 und bei 25°C in Abhängigkeit von der reziproken Glucosekonzentration für verschiedene konstante NAD-Konzentrationen (Angaben in mM neben den Linien).

b) Änderung der Achsenabschnitte (o—o) und der Abstände (●—●) der Auftragung in b) in Abhängigkeit von der reziproken NAD-Konzentration

Die auf diese Weise erhaltenen Daten sind: Michaeliskonstante für NAD, $K_a = 4,5 \text{ mM}$, Michaeliskonstante für D-Glucose, $K_b = 47,5 \text{ mM}$ und die Dissoziationskonstante für NAD, $K_{ia} = 0,69 \text{ mM}$. Bis 200 mM D-Glucose und 25 mM NAD ist keine Substrathemmung zu beobachten. Bei einem Molekulargewicht von $118\,000$ beträgt die katalytische Konstante der GlucDH $23\,500 \text{ min}^{-1}$. Die Werte K_a und K_b stimmen annähernd mit den früher in $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl Puffer pH 9 nach der Methode von Hanes (1932) gefundenen Michaeliskonstanten überein. Die Unterschiede in der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität, wie sie in Abb. 9 deutlich werden, scheinen also nicht auf eine veränderte Affinität der GlucDH gegenüber ihren

Substraten zurückzuführen zu sein, sondern müssen als Folge einer Veränderung der Zahl der Enzymmoleküle gedeutet werden, die zur Katalyse fähig sind. Inwieweit diese Zahl durch den Zerfall der GlucDH im Alkalischen festgelegt wird, ergibt die im Teil II beschriebene Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Dissoziationsgrad.

TEIL II

REVERSIBLE DISSOZIATION UND DENATURIERUNG VON GLUCOSEDEHYDROGENASE

1. Strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen tetramerer und monomerer GlucDH

1.1. Konformationsuntersuchungen

Zwei Ziele wurden bei den in den nächsten Abschnitten beschriebenen Untersuchungen verfolgt. In erster Linie sollte die Grundlage für eine einfache Methode zur Bestimmung des Dissoziationsgrads geschaffen werden. Molekulargewichtsunterschiede, wie sie im vorliegenden Fall zwischen Monomer und Tetramer bestehen, lassen sich für die quantitative Bestimmung dieser Enzymformen ausnutzen. Alle Methoden, deren Kriterium die Molekülgröße ist, erfordern jedoch einen beträchtlichen zeitlichen Aufwand und sind deshalb nur für die Untersuchung des Anfangs- und Endzustands, nicht jedoch für eine kinetische Analyse des Dissoziationsvorgangs geeignet.

Zur Bestimmung des Dissoziationsgrads können neben der Molekülgröße auch alle Parameter verwendet werden, in denen sich andere Unterschiede zwischen den an der Reaktion beteiligten Molekülen ausdrücken. Methoden, die Informationen über die Konformation und die Funktion von Enzymen liefern, sind für die Detektion solcher Unterschiede geeignet.

Durch den Vergleich der Eigenschaften von tetramerer und monomerer GlucDH wird darüber hinaus versucht, neben dem Dissoziationsgrad die Ursachen der Dissoziation zu ermitteln, da kleinste Veränderungen im Makromolekül aufgrund der Vielfalt geeigneter Methoden nachzuweisen sein sollten. Die Erzeugung der für die Untersuchungen benötigten Monomeren ist im Methoden-
teil beschrieben.

1.1.1. Optische Rotationsdispersion

Die Anwendung der optischen Rotationsdispersion, d.h. die Verfolgung der optischen Drehung in Abhängigkeit von der Wellenlänge als Hilfsmittel für das Studium von Konformationsänderungen in Proteinen hat sich in zahlreichen Fällen bewährt, in denen die durch die Bindung von Liganden oder durch Perturbationsmittel induzierten Änderungen tiefgreifend waren. Die Messungen an GlucDH wurden aufgrund der geringen verfügbaren Proteinmengen im Wellenlängenbereich des Cotton-Effekts durchgeführt, wo maximale optische Drehung auftritt (Mommaerts, 1968).

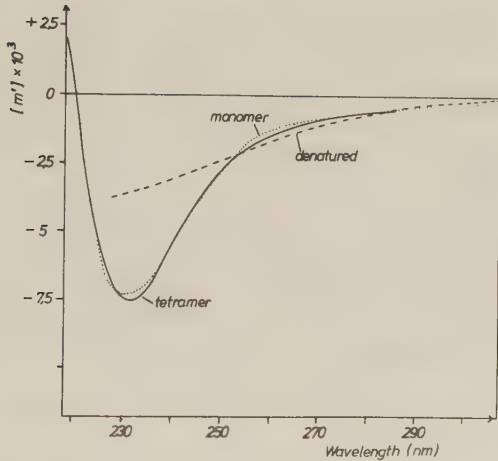


Abb. 12: Optische Rotationsdispersion

Änderung des spezifischen Drehwerts von GlucDH in 33 mM PP pH 6,5 und 0,1 M NaCl (Tetramer), 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 und 50 mM NaCl (Monomer) und in 8 M Harnstoff (Entfaltet) im Bereich des Cotton-Effekts der Peptidbindung.

Der in Abb. 12 dargestellte Verlauf der Dispersionskurve im Bereich von 220-300 nm weist nur geringfügige Unterschiede zwischen tetramerer und monomerer GlucDH auf. Da in den Zahlenwert der optischen Drehung auch die Wechselwirkungen der Proteinmoleküle mit dem Lösungsmittel und den darin gelösten Molekülen eingehen, können die beobachteten Differenzen durchaus auf die unabdingbaren pH- und Pufferionenunterschiede zurückgeführt werden. Der Helixgehalt, berechnet nach der Methode von Simmons et al. (1961), beträgt für beide Formen der GlucDH ungefähr 53 Prozent und ist somit relativ groß.

Der Bestimmung der Molekülgröße mittel Molekularsiebeffekt und Sedimentationsverhalten lag die Annahme zugrunde, daß monomere GlucDH globuläre Struktur besitzt. Die Übereinstimmung der erhaltenen Werte mit den Ergebnissen der SDS-Elektrophorese sowie der unveränderte Helixgehalt zeigen eindeutig, daß während der Dauer der Messung keine partielle Auffaltung der isolierten Polypeptidketten stattfindet, wie sie bei der pH-induzierten Dissoziation vieler bis

jetzt untersuchter Dehydrogenasen gefunden wird (McKay, 1969; Teipel und Koshland, 1971). Wird die optische Rotationsdispersion von dissoziierter GlucDH über Tage und Wochen verfolgt, beobachtet man eine Abnahme der spezifischen Drehung. Die Auffaltungsgeschwindigkeit der Polypeptidketten wird von den Bedingungen bestimmt, die für die vollständige Dissoziation gewählt werden, wobei der Enzymkonzentration eine besondere Bedeutung zukommt. Offensichtlich stellt die in den ersten Stunden nach der Dissoziation vorliegende monomere Form nur einen Übergangszustand zu einer langsam entstehenden ungeordneten Form dar. Erstaunlicherweise ist dieser Vorgang unter pH und Ionenstärkebedingungen zu beobachten, die für viele Enzyme beträchtliche Stabilität gewährleisten.

1.1.2. UV-Differenzspektroskopie

Die Standardmethode für Konformationsuntersuchungen, die UV-Differenzspektroskopie, vermag Informationen über Veränderungen zu geben, die in der Umgebung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin stattfinden. Für das Problem der GlucDH-Dissoziation erscheint diese Methode aus mehreren Gründen besonders geeignet. Aromatische Aminosäuren liefern einen wichtigen Beitrag zu hydrophoben Wechselwirkungen und sind deshalb überwiegend in lösungsmittelunzugänglichen Bereichen eines Proteins lokalisiert. Hydrophobe Wechselwirkungen haben in vielen Proteinen einen entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der Quartärstruktur (Sawyer und Puckridge, 1973). Bei einer Anzahl von drei Tryptophanresten und je neun Phenylalanin- und Tyrosinresten pro Untereinheit der GlucDH ist das Vorkommen eines oder mehrerer solcher Reste in den Kontaktzonen der Untereinheiten wahrscheinlich. Darüber hinaus ist die spezielle Fähigkeit von Tyrosin bekannt, durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Struktur von Proteinen zu stabilisieren. Die möglichen Änderungen in der Umgebung von aromatischen Aminosäureresten während der Dissoziation sollten Unterschiede in den spektroskopischen Eigenschaften ergeben, die dem Anteil der dissoziierten Moleküle proportional sind.

Das Differenzspektrum von tetramerer gegen monomere GlucDH zeigt ausgeprägte Unterschiede zwischen den beiden Enzymformen. Eine geänderte UV-Absorption monomerer GlucDH wird bei beiden möglichen Meßanordnungen beobachtet. Die Referenzküvette enthielt im ersten Fall das tetramere Enzym in 33 mM PP pH 6,5, während im zweiten Fall das tetramere Enzym in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 durch Zugabe von 1 M NaCl stabilisiert wurde. Unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeit waren keine Unterschiede zwischen den entsprechenden Differenzspektren festzustellen. Die Extinktionsdifferenzen können deshalb weder auf die pH-Differenz noch auf die Unterschiede in der Ionenstärke zurückgeführt werden, sondern sie spiegeln die Konformationsunterschiede zwischen den beiden Formen des Enzyms wider. Die Beiträge der verschiedenen Arten aromatischer Seitenreste zu den Änderungen des UV-Spektrums von GlucDH während der Dissoziation kommen in selten beobachteter Deutlichkeit zum Ausdruck.

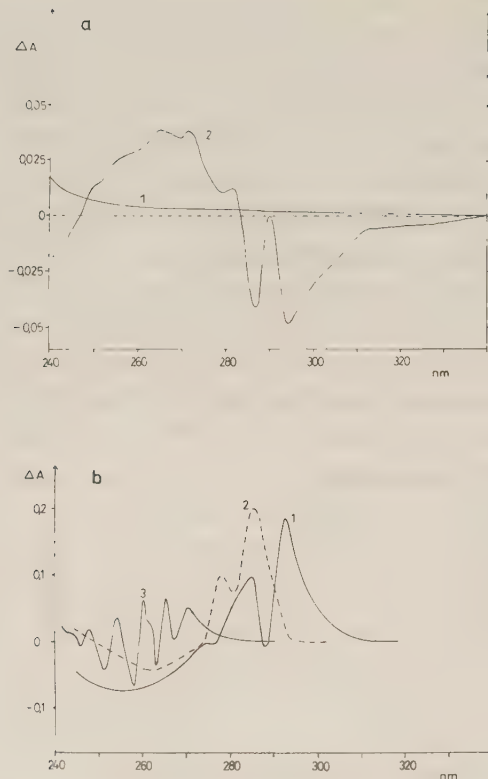


Abb. 13: a) UV-Differenzspektrum von monomerer und tetramerer GlucDH
Referenzküvette und Meßküvette enthielten in Kammer 1: 0,3 mg/ml GlucDH
in 8 mM PP pH 6,5 und 50 mM NaCl und in Kammer 2: 100 mM Gly-Tris
Puffer pH 9 und 50 mM NaCl.

Differenzspektrum 1: Überprüfung der Grundlinie. Messung vor dem Mischen
der Kammerinhalte der Meßküvette.

Differenzspektrum 2: Messung 30 Minuten nach dem Mischen der Kammerin-
halte der Meßküvette.

b) Lösungsmittelperturbationsspektrum von aromatischen Aminosäuren. Darstel-
lung nach Yanari und Bovey (1960). Perturbationsmittel: 20 % Dimethylsulfoxid

- 1: $3 \cdot 10^{-4}$ M N-Acetyl-L-Tryptophanäthylester
- 2: $1 \cdot 10^{-3}$ M N-Acetyl-L-Tyrosinäthylester
- 3: $5 \cdot 10^{-3}$ M N-Acetyl-L-Phenylalaninäthylester

Das Differenzspektrum gliedert sich in einen positiven und einen negativen Abschnitt. Die Abnahme der Extinktion im Bereich von 280 - 320 nm kann eindeutig Tryptophanresten des Enzyms zugeordnet werden. Die Übereinstimmung dieses Teils des Spektrums mit dem Lösungsmittelperturbationsspektrum von Tryptophan (Abb. 13 b), d.h. Maxima im Bereich von 292 - 294 nm und 282 - 284 nm und einem relativen Nullpunkt bei 288 nm, ist offensichtlich. Die Änderung der Tryptophanabsorption während der Dissoziation ist somit weitgehend identisch mit den Änderungen, die durch die Variation der Lösungsmittelpolarität erzielt werden können. Erste Ergebnisse einer chemischen Modifizierung der Tryptophanreste der GlucDH bestätigen das Vorliegen eines vergrabenen Rests pro Untereinheit, der erst nach der Dissoziation vom Modifizierungsreagenz angegriffen wird (Ewe et al., in Vorbereitung). Damit ist gesichert, daß der negative Bereich des Differenzspektrums in erster Linie aus der Wechselwirkung von Wasser mit einem vorher unzugänglichen Tryptophanrest resultiert. Die geänderte Absorption dieses Rests in monomerer GlucDH kann deshalb als Maßstab für das Auftreten von Untereinheiten angesehen werden.

Unabhängig von der Freilegung vergrabener Tryptophanreste können andere Vorgänge zur Verschiebung der Absorption zu kürzeren Wellenlängen beitragen. Dies sind Ladungsänderungen in der unmittelbaren Umgebung des Aromaten und die Spaltung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Indolteil von Tryptophan und anderen Aminosäureseitengruppen (Strickland, 1972). Sowohl die Form des Absorptionspeaks bei 294 nm als auch das später gezeigte Fluoreszenzpolarisationsspektrum monomerer GlucDH lassen vermuten, daß sich neben der Lösungsmittelzugänglichkeit weitere Parameter in der Umgebung des Tryptophans ändern.

Im positiven Teil des Differenzspektrums werden neben einem Beitrag, der von Tryptophan stammt, die Absorptionsänderungen der übrigen aromatischen Aminosäuren deutlich. Die Tyrosinabsorption, erkennbar an einer kleinen Schulter bei 281 nm, nimmt geringfügig zu, ebenso wie der Phenylalaninbeitrag, dessen

charakteristische Banden bei 271, 166 und 260 nm erkennbar werden. Über die Ursache dieser geringen Absorptionsänderungen können bis zum Vorliegen genauerer Ergebnisse aus chemischen Modifizierungsversuchen und aus Messungen des Circular dichroismus nur Vermutungen angestellt werden. Ladungsveränderungen im Bereich solcher Aminosäurereste bzw. die Verringerung der Lösungsmittelzugänglichkeit solcher Reste in der Coenzymbindungsregion sind denkbar. Der letztgenannten Annahme kommt besondere Bedeutung zu, da Phenylalanin und Tyrosin in verschiedenen Dehydrogenasen an der Bindung des Adeninteils des Coenzyms beteiligt sind (Jeckel et al., 1971; Rossmann et al., 1975) und bei GlucDH eine Wechselbeziehung zwischen Dissoziation und Veränderungen im Coenzymbindungsereich besteht, auf die später ausführlich eingegangen wird.

1.1.3. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz von Proteinen ist wie die Absorption auf die Anregung der aromatischen Aminosäuren zurückzuführen, wobei die Emission von Strahlung jedoch hauptsächlich den Tryptophanresten zugesprochen werden muß. Zum anderen wird die Fluoreszenz noch stärker als die Absorption durch Änderungen in der unmittelbaren Umgebung eines Chromophors beeinflusst. Die Fluoreszenzspektroskopie nimmt auch deshalb eine Sonderstellung bei der Untersuchung von Makromolekülen ein, weil die Lebensdauer des angeregten Zustands groß genug ist, um vor der Emission eine Reihe von Veränderungen im Molekül ablaufen zu lassen. Fluorophore existieren in der Regel einige Nanosekunden im angeregten Zustand, d.h. lange genug, um durch Rotationsbewegungen, chemische Reaktionen, Wechselwirkungen mit Nachbargruppen, dem Lösungsmittel und Liganden und durch Energietransfer zu benachbarten Chromophoren beeinflusst zu werden. Die Messung der Depolarisation der Fluoreszenz vermag deshalb wertvolle Hinweise auf das molekulare Geschehen in der Mikroumgebung eines Fluorophors zu geben (Weber, 1970).

Die Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie sind durch die Einführung von fluoreszierenden Verbindungen als Reportergruppen beträchtlich ausgeweitet worden. Es handelt sich um Moleküle, die entweder nichtkovalent oder kovalent an bestimmte Regionen von Proteinen gebunden werden und

Veränderungen des Proteins in ihrem Fluoreszenzverhalten widerspiegeln. Eine der gebräuchlichsten Verbindungen ist 1-Anilinonaphthalin-8-sulfonsäure (1.8 ANS), eine Substanz, die sich spezifisch an hydrophobe Regionen eines Proteins anlagert (Hartmann und Udenfried, 1969). Dieser Label zeigt in wässriger Lösung eine vernachlässigbar kleine Fluoreszenz. Die Fluoreszenzerhöhung, die bei der Bindung an Proteine unter Verschiebung der Absorption zu höheren und der Emission zu kürzeren Wellenlängen zu beobachten ist, wird auf die unpolare Umgebung der Bindungsstelle zurückgeführt. Unterschiede zwischen nativer und monomerer GlucDH in der Bindung und im Fluoreszenzverhalten von 1.8 ANS sollten deshalb Hinweise auf die Hydrophobie der Untereinheitenkontaktregionen geben können.

1.1.3.1. Fluoreszenzpolarisationsspektren

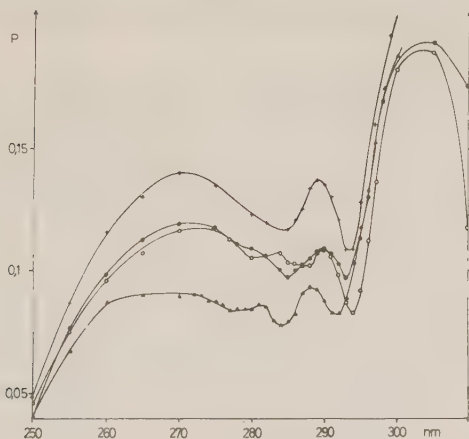


Abb. 14: Fluoreszenzpolarisationsspektrum von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH Temperatur 25°C . Emission bei 330 nm. (+) 33 mM PP pH 6,5 und 1 M NaCl; (o) 33 mM PP pH 6,5 und 50 mM NaCl; (●) 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 und 1 M NaCl; (▲) 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 und 50 mM NaCl. Die Polarisation der Fluoreszenz wurde jeweils 30 Minuten nach dem Verdünnen der Stammlösung des Enzyms in den angegebenen Puffern gemessen.

In Abb. 14 sind die Fluoreszenzpolarisationsspektren von tetramerer GlucDH unter verschiedenen Bedingungen (Spektren 1 - 3) und von monomerer GlucDH (Spektrum 4) zusammengestellt. Folgende Gesichtspunkte lassen sich bei der Deutung dieser Spektren hervorheben:

1. Der Verlauf der Spektren entspricht im wesentlichen der für Glycyltryptophylglycin in 60 %igem Glycerin bei -65°C gemessenen Fluoreszenzpolarisation (McKay, 1969), d.h. diese Spektren spiegeln vorwiegend das Fluoreszenzverhalten der drei pro Untereinheit der GlucDH enthaltenen Tryptophanreste wider.
2. Hohe Kochsalzkonzentrationen und pH 6,5 bewirken die stärkste Einschränkung der Schwingungsfreiheitsgrade von Tryptophanresten durch die Erhöhung der Starrheit der Proteinstruktur.
3. In Gegenwart geringer NaCl-Konzentrationen bzw. bei der Erhöhung der Nettoladung des Tetrameren in Gegenwart von hohen NaCl-Konzentrationen tritt bereits vor der Dissoziation eine beträchtliche Lockerung der Proteinstruktur ein.
4. Die Dissoziation zu Monomeren führt zu einer weiteren Abnahme der Polarisation über nahezu den gesamten Wellenlängenbereich. Die Größenordnung dieser Abnahme ist bei weitem geringer als für eine Auffaltung der Polypeptidkette zu erwarten wäre (Anderson und Weber, 1966). Gleichzeitig ist eine Verschiebung des charakteristischen Peaks bei 290 nm und eines kleineren Peaks bei 284 nm zu kürzeren Wellenlängen zu beobachten.
5. Dieser zweite Peak im Bereich von 281 - 284 nm tritt sowohl bei monomerer als auch bei tetramerer GlucDH nur in Abwesenheit hoher Kochsalzkonzentrationen auf und ist möglicherweise auf Tyrosinbeiträge zur Fluoreszenz zurückzuführen.

1.1.3.2. Bindung von 1,8 ANS

Im Unterschied zu der von Anderson und Weber (1966) beobachteten Zeitabhängigkeit der Bindung von 1,8 ANS an säuredissoziierte LDH wird der Endwert der relativen Fluoreszenzerhöhung bei der Titration von nativer und dissoziierter GlucDH in weniger als 10 Sekunden erreicht. In Tab. 3 sind die Ergebnisse dieser Titrations unter verschiedenen Bedingungen zusammengestellt. Die Berechnung der Parameter der Bindung des Fluoreszenzlabels an GlucDH erfolgte mit einem im Methodenteil beschriebenen Programm zur iterativen Anpassung

Tabelle 3. Auswertung der Bindungsstudien mit 1,8 ANS

Die Konzentration von GlucDH bei allen Versuchen war $5,7 \cdot 10^{-6}$ M (bezogen auf monomeres Enzym)

Bedingungen	Zahl der Bindungsstellen pro Unter-einheit	Dissoziationskonstante des GlucDH-ANS-Komplexes	Endwert der relativen Fluoreszenzerhöhung	Enzymatische Aktivität nach 1 h in %
I	1,2	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,22	100
II	2,1	$7,4 \cdot 10^{-6}$	0,41	100
III	2,0	$1,8 \cdot 10^{-5}$	0,45	95
IV	3,2	$2,1 \cdot 10^{-5}$	1,73	3
Die Bedingungen entsprechen:				
I	33 mM PP	pH 6,5 und 1 M NaCl		
II	33 mM PP	pH 6,5 und 50 mM NaCl		
III	50 mM Gly-Tris Puffer	pH 9 und 1 M NaCl		
IV	50 mM Gly-Tris Puffer	pH 9 und 50 mM NaCl		

der Werte an die theoretische Titrationskurve. Die Zunahme der Bindungszahl entspricht auffallend der Abnahme der Polarisierung der intrinsischen Fluoreszenz. Tetramere GlucDH besitzt zwei Bindungsstellen, von denen eine bei Zusatz von NaCl blockiert werden kann. Durch die Dissoziation wird eine weitere Bindungsstelle geschaffen, wobei sich die relative Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zu tetramerer GlucDH vervierfacht. Dies bestätigt eindrucksvoll den unpolaren Charakter der Bindungsstelle. In Übereinstimmung damit liegt die Verschiebung des Anregungsmaximums von 350 nm in wässriger Lösung auf 390 nm und des unkorrigierten Emissionsmaximums von 500 auf 470 nm.

1.1.4. Immunologische Untersuchungen

Weitere empfindliche Methoden zur Untersuchung von Konformationsänderungen beruhen auf der Reaktion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Für die Bindung von Antikörpern ist die Existenz antigener Determinanten erforderlich, d.h. von Strukturbereichen eines Makromoleküls, die immunspezifisch mit der bindenden Region des korrespondierenden Antikörpers, der Antideterminante, reagieren. Die dreidimensionale Struktur dieser Determinanten gewährleistet eine genaue Einpassung der Antideterminanten. Geringfügige Konformationsänderungen beeinflussen deshalb ausgeprägt die Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Die quantitative Bestimmung dieser Reaktion liefert somit einen Maßstab für das Ausmaß der Konformationsänderungen im Makromolekül. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit einem gegen tetramere GlucDH gewonnen Antiserum durchgeführt. Mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion nach Mancini et al. (1964) konnten zwischen nativer und dissoziierter GlucDH keine Unterschiede im Titer des Antiserums gefunden werden. Ein Milliliter präzipitiert $0,74 \pm 0,05$ mg der beiden Enzymformen.

In einer abgewandelten Form der Immuntitration wurden identische Mengen nativer und monomerer GlucDH mit einem geringen Überschuß an Antiserum präzipitiert. Die Berechnung der benötigten Menge an Antiserum stützte sich auf die mit der Mancini-Technik ermittelten Werte. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und dreistündiger Aufbewahrung im Kühlschrank wurde der Niederschlag abzentrifugiert und aliquote Mengen einer umgekehrten radialen

Immundiffusion unterworfen. Hierbei befand sich tetrameres Antigen im Gel und der Überstand der Zentrifugation wurde in die ausgestanzten Depots eingefüllt. Auch in diesem Experiment konnte kein Unterschied in der Flächengröße der Proben mit nativer und monomerer GlucDH beobachtet werden. Die immunologische Identität läßt sich einerseits als Beweis unveränderter Determinanten des monomeren Enzyms und andererseits als Resultat einer Antikörper-induzierten Reassoziaton monomerer GlucDH deuten. Gegen die letzte Alternative spricht die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe. Während der Tetramer-Antikörper-Komplex noch ca. 65 Prozent der Aktivität des freien nativen Enzyms aufweist, ist der Monomer-Antikörper-Komplex nach wie vor inaktiv. Die immunologischen Untersuchungen lassen also die Schlußfolgerung zu, daß die mit der Dissoziation einhergehenden Konformationsänderungen entweder außerordentlich gering sind oder daß die veränderten Bereiche, die Untereinheitenkontaktregion und das aktive Zentrum, keine antigenen Determinanten darstellen.

Die Reversibilität der Konformationsübergänge, zu denen GlucDH fähig ist, wird in Abb. 15 demonstriert. Mit Hilfe der Technik von Ouchterlony (1962) ist hier die Reaktion zwischen Antiserum gegen tetramere GlucDH und nativem, monomerem, reassoziertem und renaturiertem Enzym untersucht worden.

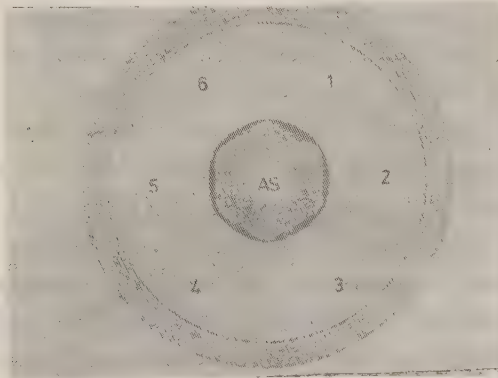


Abb. 15: Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1962)

Diffusionsmedium: 0,8 %ige Agarose in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9; 50 mM

NaCl und 20 mM NAD. Reaktion zwischen 30 μ l Antiserum im mittleren Depot und jeweils 4 μ g GlucDH in den Randdepots.

Randdepots 1, 3 und 5: Natives Enzym; 2: Monomere GlucDH; 4: Reassozierte GlucDH; 6: Renaturierte GlucDH. Die Bedingungen für die Darstellung der einzelnen Enzymformen sind an anderen Stellen der Arbeit beschrieben.

1.2. Funktionelle Unterschiede zwischen tetramerer und monomerer GlucDH

1.2.1. Enzymaktivität

Im Gegensatz zu anderen Proteinen bieten Enzyme aufgrund der katalytischen Funktionen, zu denen sie fähig sind, eine weitere Möglichkeit, minimale Konformationsänderungen zu messen, wenn diese das aktive Zentrum beeinflussen. Infolge der hohen Anforderungen, die für die Bindung der Substrate und ihre Umwandlung an die räumliche Anordnung der das aktive Zentrum bildenden Aminosäureseitenreste gestellt werden, führen bei den meisten Enzymen Konformationsänderungen zu einer Beeinflussung der enzymatischen Aktivität. Allosterische Regulation und Kooperativität sind Phänomene, die auf dieser Fähigkeit der Enzyme basieren.

Bei GlucDH bewirkt die durch die Dissoziation hervorgerufene Veränderung der Konformation einen vollständigen, jedoch - wie später gezeigt wird - reversiblen Verlust der enzymatischen Aktivität. Im normalen Aktivitätstest zeigen in der Dünnschichtgelchromatographie einheitliche Proben monomerer GlucDH eine geringe Restaktivität. Mit Hilfe einer stopped-flow Apparatur, die Messungen ab 10 msec nach dem Mischen des Enzyms mit der Testlösung erlaubte, konnte diese Restaktivität auf eine geringe Reaktivierung der GlucDH zurückgeführt werden, die in Gegenwart des Substrats und Coenzyms stattfindet. Diese Ergebnisse liefern ebenfalls die Erklärung für die enzymatische Anfärbbarkeit von monomerer GlucDH in zahlreichen Experimenten. Die Tatsache, daß dissoziierte GlucDH nur eine vernachlässigbare Aktivität im Test aufweist, bietet die einfachste und empfindlichste Methode zur Verfolgung der Dissoziation. Die untere Grenze des Konzentrationsbereichs, der bei Konformationsuntersuchungen an spektroskopische Methoden zugänglich ist, liegt bei 10^{-6} M und ist festgelegt durch die Empfindlichkeit der Absorptionsspektroskopie und durch die unvermeidbare

Anwesenheit von emittierenden Verunreinigungen bei der Fluoreszenzspektroskopie. Demgegenüber lassen sich Messungen der enzymatischen Aktivität der GlucDH noch mit hundertfach kleineren Enzymkonzentrationen durchführen.

1.2.2. Coenzymbindungsfähigkeit

Welche Ursache müssen für die Inaktivierung der GlucDH während der Dissoziation verantwortlich gemacht werden? Die Mechanismen der Katalyse, die für Dehydrogenasen postuliert werden, umfassen folgende Schritte. Dies sind die Bindung von Coenzym und Substrat, ihre Umwandlung und die Dissoziation der Enzym-Produkt-Komplexe. Von diesen Schritten ist die Ermittlung der Coenzymbindungsfähigkeit experimentell am einfachsten zugänglich. Die Bestimmung der Coenzymbindungszahl durch Fluoreszenztitration mit NADH ist in Abb. 16 dargestellt.

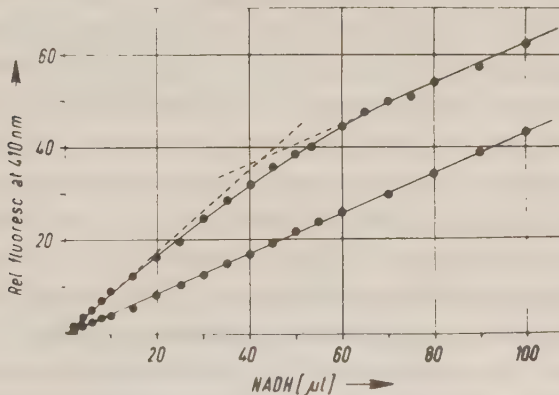


Abb. 16: Fluoreszenztitration der NADH-Bindungsstellen

Anregung 340 nm, Emission 410 nm. Steigende Mengen einer $5,55 \cdot 10^{-4}$ M NADH-Lösung wurden zu einer Lösung von 0,41 mg/ml GlucDH in 33 mM PP pH 6,5 und 0,25 M Na_2SO_4 zupipettiert und die Fluoreszenzerhöhung im Vergleich zu einer identischen Lösung ohne Enzymzusatz gemessen.

Die Methode der Fluoreszenztitration beruht auf der Erhöhung der NADH-Fluoreszenz, die bei der Bildung des binären Komplexes zwischen Dehydrogenasen und dem reduzierten Coenzym beobachtet wird. Eine Kurve, die die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration zeigt, muß daher abbiegen, wenn bei der Titration mit steigenden Mengen Coenzym alle Bindungsstellen des Enzyms besetzt sind. Daraus lassen sich die zur Absättigung notwendige Menge an NADH sowie die Dissoziationskonstante des Enzym-Coenzym-Komplexes als Maß für die Festigkeit der Bindung bestimmen.

Die Fluoreszenzerhöhung von NADH in Gegenwart von GlucDH ist gering und kann durch die Zugabe von Substrat und Inhibitoren nicht verbessert werden, wie es Sund (1968) bei Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber gelang. Die Auswertung mit dem im Methodenteil beschriebenen Rechenprogramm ergibt zwischen 3,2 und 4,5 Bindungsstellen pro Tetramer der GlucDH und einen Wert von $2,1 \cdot 10^{-3}$ M für die Dissoziationskonstante des GlucDH-NADH-Komplexes. Als Folge dieser äußerst geringen Affinität der GlucDH gegenüber NADH ist die Bestimmung der Bindungszahl aus der Polarisation der NADH-Fluoreszenz nicht möglich. Die Beeinflussung der Dissoziation der GlucDH zu Untereinheiten durch NAD, die im Kapitel II.2.4. beschrieben wird, liefert jedoch eindeutige Werte, die die mit Hilfe der NADH-Fluoreszenztitration ermittelten Bindungszahlen bestätigen. GlucDH vermag - wie die meisten Dehydrogenasen - pro Untereinheit ein Coenzymmolekül zu binden, besitzt also im nativen Zustand wahrscheinlich vier aktive Zentren. Im dissoziierten Zustand ist dagegen die Coenzymbindungsfähigkeit vollständig verschwunden und wird auch in Gegenwart von NADH innerhalb von 96 Stunden nicht regeneriert. Die Inaktivität monomerer GlucDH ist also auf eine veränderte Anordnung der Aminosäureseitenreste in der Coenzymbindungsregion zurückzuführen, die den ersten Schritt der Katalyse, die Anlagerung von NAD, verhindert.

1.3. Korrelation zwischen Enzymaktivität und Konformationsänderungen

In Abb. 17 ist die zeitliche Änderung der verschiedenen spektroskopischen Parameter mit der Änderung der enzymatischen Aktivität während der Dissoziation in Beziehung gebracht werden. Zusätzlich wurde die NAD-Bindungsfähigkeit, deren

Bestimmung im Kapitel II.2.4. geschildert wird, als weiterer Parameter aufgenommen. Die direkte Wechselbeziehung zwischen den Änderungen der enzymatischen Aktivität, der UV-Absorption und der Coenzymbindungsfähigkeit zeigt, daß für die Änderung der verschiedenen Eigenschaften ein Vorgang verantwortlich ist, der sich unter den experimentellen Bedingungen nicht in Einzelschritte aufspalten läßt. Die Auswirkungen dieses Vorgangs werden gleichzeitig meßbar in zwei Bereichen des Moleküls, dem aktiven Zentrum und der Untereinheitenbindungsregion. Eine direkte Wechselwirkung dieser beiden Regionen ist deshalb anzunehmen, wie sie bisher nur in Dehydrogenasen gefunden wurde, die regulatorische Eigenschaften zeigen. Die Deutlichkeit, mit der diese Beziehung bei GlucDH nachgewiesen werden kann, beruht auf der Tatsache, daß alle anderen Bereiche des Enzyms offensichtlich während der Dissoziation unverändert bleiben. Ob die Ursache dieser Wechselwirkung in der räumlichen Nähe der betreffenden Regionen zu suchen ist in Analogie zur Gyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, deren allosterische Regulation durch diese Tatsache ermöglicht wird (Rossmann et al., 1975) oder in einer direkten Verbindung dieser Regionen über weitreichende strukturelle Teileinheiten des GlucDH-Moleküls, bleibt unklar.

Keine Korrelation ist zwischen der Abnahme der intrinsischen Fluoreszenzpolarisierung und der der anderen Parameter festzustellen. Bereits in weniger als 30 Sekunden ist die Polarisation um mehr als die Hälfte der Gesamtabnahme vermindert, während die Enzymaktivität noch über 80 Prozent beträgt. Dies bedeutet, daß sehr schnell nach der Umstellung des pH-Werts aufgrund der höheren negativen Nettoladung und der damit erhöhten elektrostatischen Abstoßung die Beweglichkeit der Tryptophanreste der GlucDH zunimmt. Diese allgemeine Auflockerung der Struktur trägt zum überwiegenden Teil zur Gesamtabnahme der Fluoreszenzpolarisierung bei, führt jedoch noch nicht zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Erst nach dieser Auflockerung folgt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dissoziation, eine durch die Deprotonierung bestimmter Seitenreste induzierte langsame Konformationsänderung, die die Änderung der oben diskutierten anderen Parameter bewirkt. In den folgenden Untersuchungen zum Mechanismus der Dissoziation werden die Experimente geschildert, die die aus den Konformationsuntersuchungen gezogenen Schlüsse bestätigen sollen.

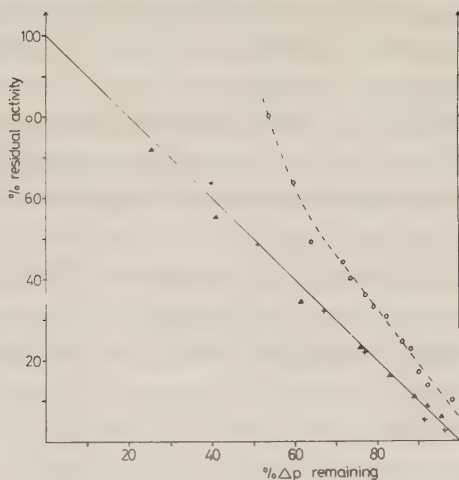


Abb. 17: Korrelation zwischen Enzymaktivität und anderen Parametern

Grundlage dieser Abbildung sind die gemessenen spektroskopischen und funktionellen Unterschiede zwischen nativer und monomerer GlucDH. Die Gesamtänderung der verschiedenen Parameter p wurde als 100 Prozent angenommen. Die prozentuale Änderung während des Dissoziationsvorganges ist in Beziehung gebracht mit der Änderung der Restaktivität. Die Parameter sind:

- (o) Prozentuale Änderung des Polarisationsunterschieds zwischen nativer und monomerer GlucDH
- (+) Abnahme der Coenzymbindungsfähigkeit der GlucDH
- (▲) Abnahme der Differenzabsorption bei 292 nm

2. Untersuchungen zum Mechanismus der Dissoziation

2.1. Einfluß des pH-Werts

In den bisher geschilderten Ergebnissen wird die entscheidende Rolle des pH-Werts für die Dissoziation der GlucDH bereits angedeutet. Die Wechselbeziehung zwischen Dissoziation und Inaktivierung, die in Kapitel II.1.3. herausgearbeitet wurde, erlaubt die Verfolgung des Dissoziationsvorgangs anhand des einfachen Aktivitätstests.

2.1.1. Die Reversibilität der Dissoziation

Gereinigte GlucDH zeigt in Gegenwart hoher Ionenstärke eine bemerkenswerte Stabilität im pH-Bereich zwischen 4 und 11. In Lösungen geringer Ionenstärke tritt dagegen bereits bei physiologischen pH-Werten von 7-7,5 nach 30 Minuten eine weitgehende Inaktivierung ein, die im sauren Milieu erst unter pH 3,5 zu beobachten ist (Abb. 18). Unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen gelingt für bei pH 8,5 inaktivierte Proben die vollständige Wiederherstellung der Ausgangsaktivität durch Rückstellen des pH-Werts auf pH 6,5, während für säuredenaturierte GlucDH keine Reaktivierung erzielt werden kann.

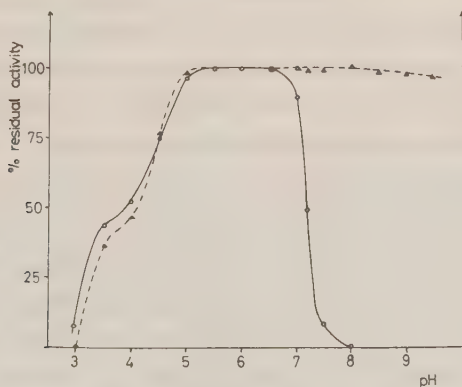


Abb. 18: pH-induzierte Inaktivierung und Reaktivierung von GlucDH (o—o) Reaktivität von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH nach dreißigminütiger Inkubation bei 25°C in Abhängigkeit vom pH-Wert (siehe Methodenteil). Start der Reaktivierung nach 30 Minuten. (Δ — Δ) Reaktivierungsgrad nach weiteren 30 Minuten

In Abb. 19 ist der zeitliche Verlauf der Inaktivierung und der Reaktivierung alkalidissoziierter GlucDH dargestellt. Rinderserumalbumin und Glucose haben keinen Einfluß auf die Dissoziation. NAD in einer Konzentration, die dem fünfzehnfachen der für pH 9 kinetisch ermittelten Dissoziationskonstante K_{ia} von $6,9 \cdot 10^{-4}$ M entspricht (vergl. 1.6.2), hemmt vollständig die Inaktivierung.

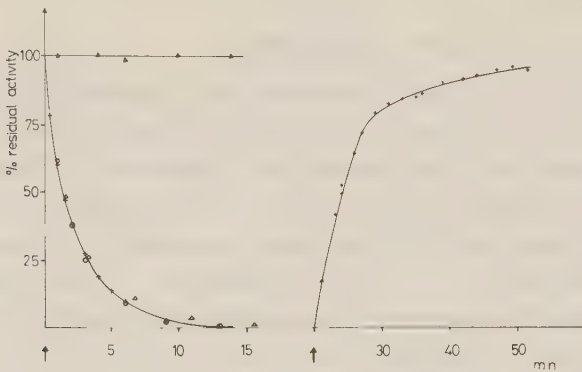


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der reversiblen pH-induzierten Dissoziation Inaktivierung und Reaktivierung wie im Methodenteil beschrieben von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH bei 25°C . Die Markierungen geben den Zeitpunkt der pH-Änderung von pH 6,5 auf 9 bzw. den Start der Reaktivierung an.

Aus der logarithmischen Auftragung der jeweiligen Reaktivität wird deutlich, daß die Inaktivierung der GlucDH eine Reaktion erster Ordnung ist, in Übereinstimmung mit der überwiegenden Zahl aller bisher untersuchten Fälle von Enzym-inaktivierung bzw. Proteinendenaturierung (Abb. 20a). Der monomolekulare Verlauf der GlucDH-Inaktivierung ist gesichert für einen Konzentrationsbereich von $0,5\text{--}100 \mu\text{g/ml}$. Die Wiedergewinnung der Ausgangsaktivität verläuft ebenfalls nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung (Abb. 20b). Dies bedeutet, daß als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktivierung nicht der Assoziationsprozeß, sondern eine diesem vor- oder nachgeschaltete Konformationsänderung anzusehen ist. Außerdem scheinen in der Reaktivierungslösung unter-

schiedliche Molekülformen aufzutreten, die mit verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten ihre Aktivität zurückgewinnen, wie aus dem biphasischen Verlauf der Auftragung zu entnehmen ist.

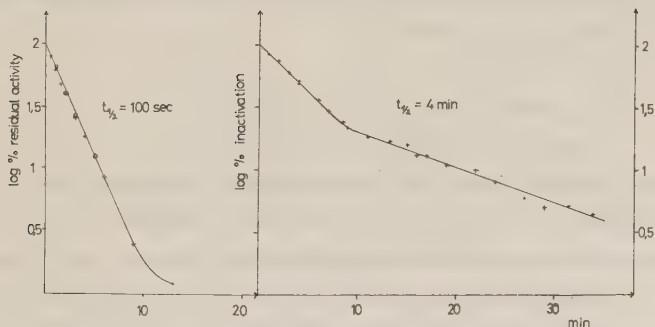
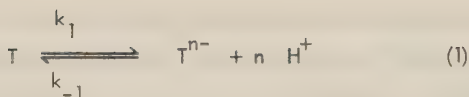


Abb. 20: a) Reaktionsordnung der Inaktivierung

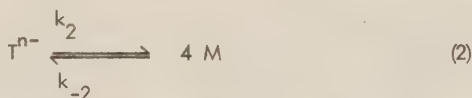
b) Reaktionsordnung der Reaktivierung

2.1.2. Die Reaktionsgeschwindigkeit und das Gleichgewicht der Dissoziation

Die in diesem Abschnitt in den Abb. 21-23 dargestellten Ergebnisse der kinetischen Messungen erlauben, eine erste Hypothese zum Mechanismus der Dissoziation und speziell zur Bedeutung des pH-Werts für diesen Vorgang aufzustellen. Das im folgenden dargestellte Modell ermöglicht eine quantitative Aussage über die Beteiligung von H^+ -Ionen und gibt erste Hinweise auf den Charakter von Gruppen auf der Proteinoberfläche, deren Verhalten die Dissoziation verursacht. Aufgrund der starken pH-Abhängigkeit des Zerfalls zu Untereinheiten ist ein Deprotonierungsschritt anzunehmen, bei dem ein tetrameres GlucDH-Molekül n Protonen abgibt und seine Nettoladung somit um n negative Ladungen vergrößert.



Reaktion (1) ist wie die meisten Protonenreaktionen ein schneller Vorgang, der in der Anfangsphase unmittelbar nach der Erhöhung des pH-Werts stattfindet. Es folgt unter Verlust der Quartärstruktur Reaktion (2), die die relativ langsame Konformationsänderung des aktiven Zentrums, die Ursache für den Aktivitätsverlust, beinhaltet.



M bezeichnet in diesem Schema die inaktive isolierte Untereinheit und stellt das vorläufige Endprodukt eines möglicherweise komplexeren Vorgangs dar, dessen Aufgliederung mit den hier beschriebenen Messungen nicht möglich ist. Das Deprotonierungsgleichgewicht (3) geht in die Beschreibung der Inaktivierungsgeschwindigkeit (4) am Anfang der Inaktivierung ein, wobei sich die jeweilige Restaktivität aus den Anteilen von T und T^{n-} summiert.

$$K_D = \frac{[T^{n-}] \cdot [H^+]^n}{[T]} \quad (3)$$

$$- \frac{d \text{ Aktivität}}{dt} = k_2 \cdot [T^{n-}] = k_2 \cdot K_D \cdot \frac{[T]}{[H^+]^n} \quad (4)$$

Es wird vorausgesetzt, daß die Deprotonierung selbst noch keinen Aktivitätsverlust bewirkt. Während der ersten Minuten der Inaktivierung bleibt T^{n-} nahezu konstant, da das deprotonierte Tetramer schneller, als es zerfällt, nachgebildet wird. In diesem Zeitraum vereinfacht sich Gleichung (4) für die Inaktivierungsgeschwindigkeit, da

$$\begin{aligned} \frac{d [T^{n-}]}{dt} &= 0 \\ - \frac{d [T]}{dt} &= k_2 \cdot K_D \cdot \frac{[T]}{[H^+]^n} \quad (5) \end{aligned}$$

$$-\ln \frac{[T]}{[T]_0} = k' = k_2 K_D [H^+]^{-n} t \quad (6)$$

$$\log k' = n \text{ pH} + \text{const} \quad (7)$$

Später nimmt die Rückreaktion einen solchen Umfang an, daß die Gesamtinaktivierungsrate abnimmt und kein linearer Verlauf der logarithmischen Auftragung der Restaktivität gegen die Zeit gewährleistet ist (Abb. 21).

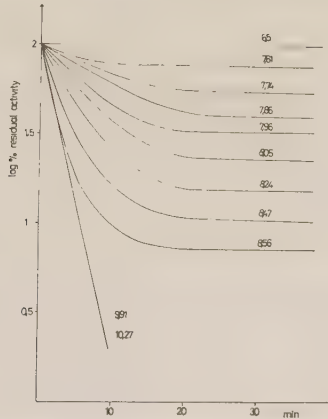


Abb. 21: pH-Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit und des Dissoziationsgrads

Inkubation von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5-8,7 bzw. 50 mM Gly-Tris Puffer pH 8, 6-10, 27 ohne NaCl-Zusatz. Temperatur 25°C . In den ersten vier Minuten der Inaktivierung wurde im Intervall von 30 Sekunden die Restaktivität bestimmt und die Geschwindigkeitskonstante k' durch Anlegen einer Tangente an die Anfangssteigung der logarithmischen Auftragung ermittelt.

Entscheidend für die Inaktivierung sollte nach den bisherigen Überlegungen der Dissoziationsgrad von ionisierbaren Gruppen auf der Oberfläche des GlucDH-Moleküls sein. Während bei pH 6,5 diese Gruppen vollständig protoniert sind und deshalb keine Inaktivierung meßbar ist, gilt für den anderen Grenzfall, den der völligen Dissoziation dieser Gruppen, folgende Betrachtung. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit (8) geht für $T \rightarrow 0$ in den Ausdruck (9) über.

$$- \frac{d \{ [T] + [T^{n-}] \}}{dt} = k_2 [T^{n-}] \quad (8)$$

$$- \frac{d [T^{n-}]}{dt} = k_2 [T^{n-}] \quad \text{bzw.}$$

$$- \frac{d [T^{n-}]}{[T^{n-}]} = k_2 dt \quad (9)$$

Dies bedeutet, daß durch eine Erhöhung des pH-Werts über den Bereich hinaus, bei dem T vollständig deprotoniert vorliegt, keine weitere Steigerung der Inaktivierungsgeschwindigkeit erzielt werden kann.

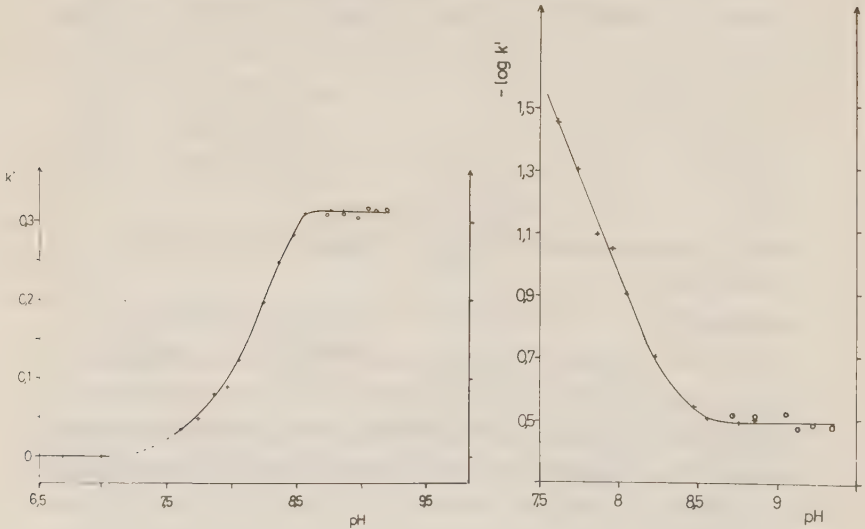


Abb. 22: a) pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten

b) Bestimmung der Zahl der an der Inaktivierung beteiligten Protonen nach Gleichung (7)

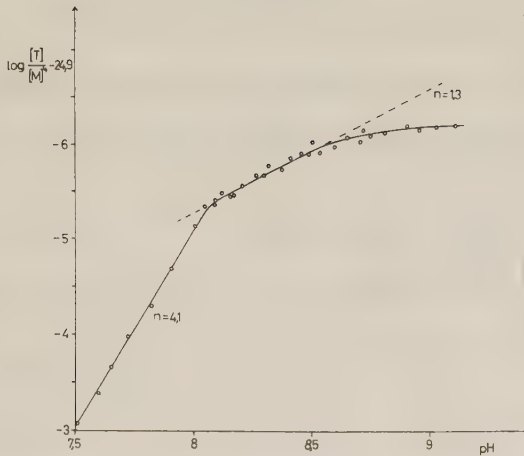


Abb. 23: pH-Abhängigkeit des Dissoziationsgleichgewichts

Bedingungen wie in Abb. 21, jedoch jeweils 50 mM NaCl-Zusatz. Zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten wurde der Mittelwert der Restaktivität nach einer Inkubationsdauer von 30 bis 45 Minuten benutzt.

Aus den Abb. 22a und b ist ersichtlich, daß dies ab pH 8,5 zutrifft. Dies unterstreicht, daß am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion (2) keine Protonen beteiligt sind. Aus der Inaktivierungsgeschwindigkeit bei hohen pH-Werten läßt sich die Geschwindigkeitskonstante k_2 berechnen. Sie beträgt bei 25°C unter den Standarddissoziationsbedingungen $0,22 \text{ min}^{-1}$.

Die Gleichgewichtskonstante K_{tot} der Gesamtreaktion ist dagegen im Bereich von pH 7,5-8,5 zu ermitteln. In K_{tot} (11) sind die beteiligten Einzelgleichgewichte (3) und (10) enthalten.

$$K_D = \frac{[T^{n-}] [H^+]^n}{[T]} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{[M]^4}{[T^{n-}]} \quad (10)$$

$$K_{\text{tot}} = K_D \quad K_2 = \frac{[M]^4 [H^+]^n}{[T]} \quad (11)$$

Die Auftragung von $\log [T] / [M]^4$ gegen den pH-Wert ermöglicht die Berechnung der Zahl der beteiligten Protonen der Reaktion (1) aus der Beziehung (12).

$$\log \frac{[T]}{[M]^4} = npH - \log K_{\text{tot}} \quad (12)$$

Aus Abb. 23 geht hervor, daß im pH-Bereich 7,5-8,1 pro Untereinheit der GlucDH ein Proton abgespalten wird. Inkubiert man das Enzym bei höheren pH-Werten, ist sowohl aus der Auftragung der pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten als auch aus der von K_{tot} erkennbar, daß bereits die Abgabe von einem Proton pro Tetramer den Verlust der Aktivität hervorruft. Dies läßt sich auf die weitere allgemeine Zunahme der negativen Gesamtladung und die dadurch erhöhte elektrostatische Abstoßung zurückführen. Über pH 8,5 schließlich sind die Inaktivierungsgeschwindigkeit und das Gleichgewicht pH-unabhängig und erreichen die Grenzwerte k_2 und $k_2/k_{-2} = K_2$. Bei 25° C besitzt K_2 den Wert $1,6 \cdot 10^{-24} \text{ M}^3$. Die mit diesem Reaktionsschritt verknüpfte Änderung der freien Enthalpie ΔG beträgt $32,4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

GlucDH vermag also zwischen pH 7 und pH 9 in zahlreichen Ionisierungszuständen aufzutreten, wie es aufgrund der Vielfalt der Aminosäureseitenreste zu erwarten ist. Bis etwa pH 8 wird die Dissoziation des Enzyms von einer Gruppe mit einem pK-Wert von $\cong 8,1$ bestimmt (Abb. 22a). Der Kurvenverlauf entspricht bis zu dem angegebenen Wert dem einer Titrationskurve für das beteiligte Säure-Basen-Paar. Bei höheren pH-Werten werden die oben diskutierten zusätzlichen Ladungseinflüsse wirksam und der aus Abb. 22a entnommene pK-Wert kann deshalb nur als Anhaltswert betrachtet werden. Dennoch erlaubt er die Aussage, daß mit großer Wahrscheinlichkeit nur α -Aminogruppen, ϵ -Amino- oder Imidazolseitenreste für den Auslö-

sungsmechanismus der Dissoziation relevant sind. Die Beteiligung von Cysteinresten ist aufgrund der Aminosäureanalysen und die von Tyrosin aufgrund der Ergebnisse der UV-Differenzspektroskopie wenig wahrscheinlich.

2.2. Temperatureinfluß und thermodynamische Daten

Die Erhöhung der Temperatur verschiebt das Dissoziationsgleichgewicht in Richtung dissoziierter GlucDH. Die aus dieser Abhängigkeit zu ermittelnden thermodynamischen Größen geben weitere Aussagen über die Teilreaktionen und den Gesamtvorgang der Dissoziation. Die grundlegende Beziehung zwischen der Gleichgewichtskonstante K einer Reaktion und der Temperatur ist die van't Hoff-Gleichung (13).

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad \text{bzw.} \quad \frac{d \ln K}{d \frac{1}{T}} = \frac{\Delta H}{R} \quad (13)$$

Ist die Reaktionsenthalpie ΔH unabhängig von der Temperatur, ermöglicht die Auftragung von $\ln K_{\text{tot}}$ gegen T^{-1} die Berechnung von ΔH . Dadurch ist die Größe der Entropieänderung ΔS mit Hilfe der Beziehung (14) zu erhalten, da $\Delta G = -RT \ln K_{\text{tot}}$ bekannt ist.

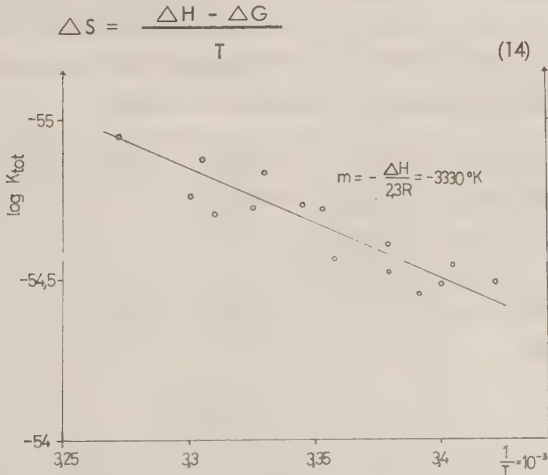


Abb. 24: Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten K_{tot} der Dissoziation von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,75 und 50 mM NaCl

Die Größenordnung von ΔS ist ein Maßstab für die mit der Dissoziation einhergehenden Konformations- und Solvatisierungsänderungen. Die aus Abb. 24 erhaltenen Werte bei pH 7,75 und 25°C sind:

$$\begin{aligned}\Delta H &= 2,9 \text{ kcal mol}^{-1} \\ \Delta S &= -240 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \\ \Delta G &= 74,3 \text{ kcal mol}^{-1}\end{aligned}$$

Für die Reaktionsenthalpie ΔH erhält man auf diese Weise einen zusammengesetzten Wert, der die Summe der Enthalpieänderungen in beiden Teilreaktionen (1) und (2) darstellt. Voraussetzung für die Dissoziation ist die Deprotonierung von vier Aminosäureseitenketten mit pK-Werten von etwa 8,1. Die Enthalpieänderungen, die durch die Deprotonierung der für die Dissoziationsauslösung relevanten Gruppen verursacht werden, liegen in der Größenordnung von -7 bis -10 kcal mol⁻¹ pro freigesetztem Proton (Cohn und Edsall, 1943). Die Konformationsänderungen während der Dissoziation steuern nach diesen Überlegungen also einen positiven Beitrag von 31 bis 43 kcal mol⁻¹ zur Gesamtenthalpieänderung bei.

Die Entropieänderung der Reaktion ist negativ. Dies bedeutet eine Zunahme des Ordnungsgrads, die möglicherweise durch die Solvatisierung der entstehenden Ladungen verursacht wird und den durch den Verlust der Quartärstruktur gelieferten positiven Entropiebeitrag zu kompensieren vermag.

Weitere thermodynamische Daten erhält man aus der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungskonstante k_2 bei pH 9. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit ist bei diesem pH-Wert unabhängig von der Protonkonzentration, d.h. die aus der Arrhenius-Auftragung (Abb. 25) entnommenen Werte für die Aktivierungsenthalpie $\Delta G^\ddagger$ beziehen sich auf den Vorgang (2). Die Werte für 25°C sind:

$$\begin{aligned}k_2 &= 0,22 \text{ min}^{-1} \\ E &= 0,4 \text{ kcal mol}^{-1} \\ \Delta H^\ddagger &= 0,15 \text{ kcal mol}^{-1} \\ \Delta S^\ddagger &= -65 \text{ cal mol}^{-1} \text{ }^\circ\text{K}^{-1} \\ \Delta G^\ddagger &= 19,4 \text{ kcal mol}^{-1}\end{aligned}$$

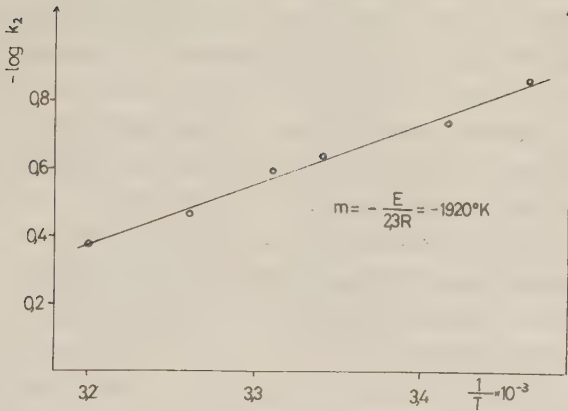


Abb. 25: Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit Inkubation von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 bei verschiedenen Temperaturen.

Die Aktivierungsenergie des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Dissoziation (2) ist außerordentlich gering und der Ordnungsgrad des Übergangszustandes um 65 Entropieeinheiten erhöht. Es gibt bis jetzt nur sehr wenige Daten über Aktivierungsgrößen von induzierten Konformationsänderungen in Proteinen. Generell sind solche Änderungen im Makromolekül auf kleine Bereiche beschränkt, die fest in die unveränderte Gesamtstruktur integriert sind. Deshalb ist die Aktivierungsenergie solcher Vorgänge wesentlich höher als bei kleinen Molekülen und bei Makromolekülen mit frei beweglicher Kette. Die $\Delta H^\ddagger$ -Werte für die GlucDH-Transition sind daher äußerst klein und nur vergleichbar mit den Werten, die French und Hammes (1964) für die Umwandlung von zwei Ribonuclease-Konformeren fanden. Die Beteiligung von Solvatisierungseffekten und die mögliche Lösung von Ionenpaar- und Wasserstoffbrückenbindungen machen die Interpretation dieser Werte jedoch sehr schwierig.

2.3. Bedeutung der Ionenstärke und Ionenart

Bei der Diskussion der Beeinflußbarkeit von Eiweißmolekülen durch Ionen von Neutralsalzen sind zwei Effekte zu unterscheiden. Neben einem Ioneneinfluß allgemeiner Art, wie er in der Abhängigkeit der Aktivitäten der an einem chemischen Gleichgewicht beteiligten Reaktanden zum Ausdruck kommt, beeinflussen Ionen durch ihre spezifischen lokalen Wechselwirkungen die Konformation von Proteinen. Das Ausmaß der Affinität zwischen Bindungsstellen auf der Proteinoberfläche und bestimmten Ionen hängt von der Geometrie der Bindungsstelle ab, d.h. vom Abstand der Ladungen und polaren Gruppen sowie von Radius und Polarisierbarkeit der Ionen. Ein dritter Effekt von Ionen ist die indirekte Beeinflussung der Konformation durch die Veränderung des Lösungsmittels Wasser. Bestimmte Anionen stören die geordnete Struktur des Wassers. Die durch solche chaotropen Ionen bewirkte Entropieerhöhung ermöglicht eine bessere Löslichkeit von apolaren Proteinbereichen. Die Fähigkeit dieser Ionen zum "salting-in" ist das Ordnungsprinzip der Hofmeister-Reihe (Hofmeister, 1888), in der die gebräuchlichsten Anionen zusammengestellt sind. Es gelingt deshalb mit Hilfe hoher Konzentrationen von Thiocyanaten, Trifluoracetaten und Perchloraten in zahlreichen Fällen, Proteinaggregate zu dissoziieren, deren Zusammenhalt vorwiegend durch hydrophobe und van der Waals-Kräfte bewirkt wird. Die Beeinflußbarkeit der Dissoziation von GlucDH durch Ionen wurde deshalb unter diesen drei Gesichtspunkten untersucht. In Tab. 4 ist die Bedeutung der Ionenart für die Verhinderung der Dissoziation dargestellt:

1. Dem Anion scheint vorrangige Bedeutung bei der Stabilisierung der Quartärstruktur zuzukommen.
2. Die Effektivität innerhalb der Gruppe der Halogenide ist entgegengesetzt der Hofmeister-Reihe.
3. Das Verhalten der GlucDH in Gegenwart stark chaotroper Ionen ist identisch mit dem in Abwesenheit von Salzen. Der chaotrope Effekt dieser Ionen wird offenbar von einem stabilisierenden Effekt kompensiert.

Bei pH 6,5 nimmt die enzymatische Aktivität von GlucDH erst bei NaSCN -Konzentrationen über 1,5 M ab, und in der Dünnschichtgelchromatographie konnte in 1 M NaSCN keine monomere GlucDH nachgewiesen werden.

Tab. 4: Einfluß der Ionenart auf das Dissoziationsgleichgewicht

Salz	% RA	Salz	% RA	Salz	% RA	Salz	% RA	Salz	% RA
NaF	10	Na ₂ SO ₃	55	NaSCN	2	NaOOCH	25	LiCl	62
NaCl	73	Na ₂ SO ₄	35	NaClO ₄	2,5	NaOOCH ₃	22	NaCl	74
NaBr	91	NaNO ₃	39	NaOOCCH ₃	4	Natrium- glutaminat	11	RbCl	69
NaI	95	NaN ₃	33	Blindwert	2			CsCl	50

% Ra entspricht der Restaktivität von $4 \cdot 10^{-8}$ M GlucDH nach dreißigminütiger Inkubation in 100 mM Gly-Tris-Puffer pH 8,5 bei 25°C. Die Konzentration aller Salze im Ansatz war 0,2 M. Lösungen der Salze schwacher Säuren wurden mit Ameisensäure auf pH 6,5 eingestellt.

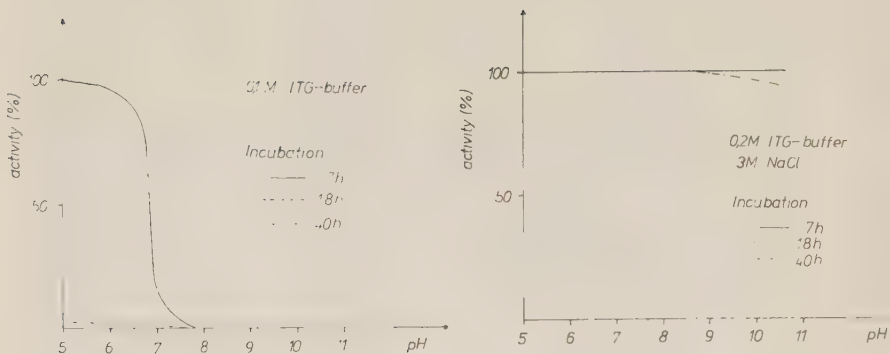


Abb. 26: Einfluß von NaCl auf das Dissoziationsgleichgewicht von $4 \cdot 10^{-8}$ M GlucDH in Imidazol-Tris-Gly Puffer

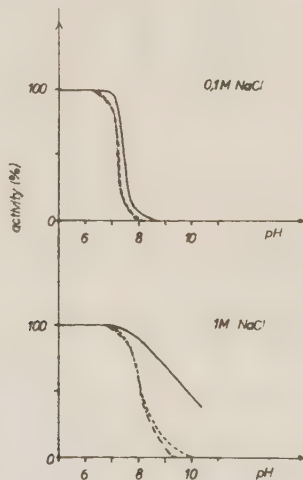


Abb. 27: Einfluß von NaCl auf das Dissoziationsgewicht von $4 \cdot 10^{-8}$ M GlucDH in Imidazol-Tris-Gly Puffer

Dies unterstreicht die untergeordnete Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen für die Aufrechterhaltung der Quartärstruktur. In Lösungen stark verdünnter GlucDH ($4 \cdot 10^{-8}$ M) tritt beim Fehlen geeigneter Anionen in 0,1 M Puffer selbst bei pH 6,5, dem pH-Optimum der Stabilität, nach 18 Stunden vollständige Inaktivierung ein (Abb. 26). Dagegen ist in 3 M NaCl selbst nach vierzigstündiger Inkubation bei pH 10,5 die Inaktivierung vernachlässigbar. Aus der pH-Abhängigkeit der Inaktivierung bei mittleren Ionenstärken ist eine langsame Einstellung des Gleichgewichts erkennbar, die in Gegenwart von 0,1 M NaCl zu einer Restaktivität von 50 Prozent bei pH 7,3 und in Gegenwart von 1 M NaCl bei pH 8,1 führt (Abb. 27). Dieses Gleichgewicht beinhaltet die langsame Weiterreaktion des entstandenen Monomeren. Die Analyse des Einflusses von Neutralsalzen unter Bedingungen, bei denen die Weiterreaktion vernachlässigbar ist, kann anhand der in Abb. 28 dargestellten Messungen erfolgen. In Analogie zu den am Gleichgewicht beteiligten Protonen kann die Zahl der zusätzlich vom Tetramer gebundenen Ionen aus den negativen Anstiegen der logarithmischen Auftragung von $\log T/M^4$ gegen den Logarithmus der Ionenaktivitäten ermittelt werden (Sawyer und Puckridge, 1973). Nur im Bereich unter 0,1 M Neutralsalz ist eine lineare Beziehung zwischen den aufgetragenen Größen gegeben. Aus den Anstiegen ist zu entnehmen, daß bei pH 8,0 etwa 0,7 bis 0,9 Moleküle NaCl bzw. NaJ pro Untereinheit der GlucDH während der Dissoziation freigesetzt werden. Aufgrund der Anwesenheit von Pufferionen, möglicher Hydratisierungsänderungen während der Dissoziation und der ungeklärten Frage, ob nur die Anionen oder auch die Kationen von Neutralsalzen bevorzugt gebunden werden, ist es schwierig, die Stöchiometrie einer Beteiligung von Ionen am Dissoziationsgleichgewicht aus den Ergebnissen der Abb. 28 abzuleiten. Wahrscheinlich werden bei pH 8 ein oder zwei Anionen pro Untereinheit der GlucDH während der Dissoziation freigesetzt. Diese Zahl verringert sich bei pH 8,5 auf etwa ein bis zwei Anionen pro Tetramer. Trotz des hohen Unsicherheitsfaktors, den man bei diesen Zahlen berücksichtigen muß, ist die Parallelität zu der Beteiligung von Protonen am Dissoziationsvorgang offensichtlich.

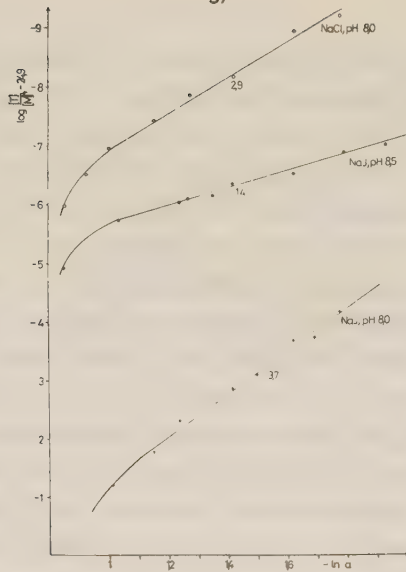


Abb. 28: Einfluß der Neutralsalzkonzentration auf das Dissoziationsgleichgewicht der GlucDH

Inkubation von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 50 mM Tris-Formiat Puffer pH 8,0 bzw. pH 8,5 unter Variation der Neutralsalzkonzentration.

2.4. Die Bedeutung der Coenzymbindungsstelle

Der Verlust der Coenzymbindungsfähigkeit, der mit der Dissoziation einhergeht und die Inaktivierung der GlucDH hervorruft, basiert offensichtlich auf Veränderungen der NAD-Bindungsregion. Inwieweit diese Verformung als Folge oder als auslösender Faktor der Dissoziation angesehen werden muß, läßt der Einfluß von NAD auf die Dissoziation erkennen. Das Coenzym vermag in höherer Konzentration die Inaktivierung vollständig zu unterbinden (Abb. 29 und 30). In der hier nicht dargestellten Dünnschichtgelchromatographie von GlucDH bei pH 9 in Gegenwart von 20 mM NAD tritt nur tetrameres Enzym auf, d.h. die Dissoziation wird ebenfalls verhindert. Monomere GlucDH wird dagegen durch Zugabe von NAD nicht reaktiviert. Dies macht deutlich, daß mehrere Reaktionsschritte an der Dissoziation beteiligt sein müssen, wobei sich der Verlust der NAD-Bindungskapazität in der Anfangsphase ereignet. Dieser Schritt wird durch die Bildung des Enzym-NAD-

Komplexes verhindert. Die Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit der Stabilisierung durch NAD unter der Annahme, daß die Restaktivität nach Einstellung des Gleichgewichts (Abb. 30) dem Anteil des durch NAD komplexierten Enzyms proportional ist, führt zu einer äußerst einfachen Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Enzym-NAD-Komplexes (siehe Methodenteil). Es bot sich an, anhand dieses Stabilisierungseffekts die Bedeutung einzelner Teilbereiche des NAD-Moleküls für die Coenzymbindung und das Bindungsvermögen von Coenzymanalogen abzuschätzen, wie es McPherson (1970) durch enzymkinetische Messungen und durch Röntgenstrukturuntersuchungen an LDH-Kristallen oder Mitarbeiter unseres Lehrstuhls in jüngster Zeit mit Spinlabelderivaten erreichten (Wenzel et al., 1976). Die von mir angewandte Methode bietet einerseits den Vorteil, daß das Verhalten des Enzyms in Lösung studiert werden kann, und schließt andererseits durch den Spinlabel hervorgerufene Effekte aus. Bemerkenswert ist die Übereinstimmung der auf diese Weise bestimmten Dissoziationskonstanten für NAD und NADH mit den enzymkinetisch und fluorimetrisch ermittelten Werten. Nur bedingt entsprechen die Relationen der in Tab. 5 aufgeführten Dissoziationskonstanten der binären Komplexe von GlucDH den Beobachtungen an anderen Dehydrogenasen.

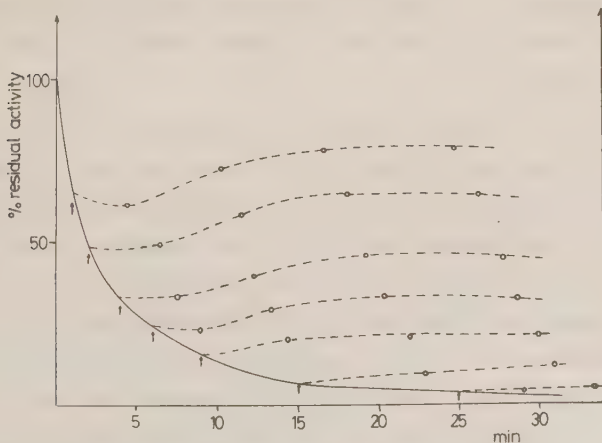


Abb. 29: Einfluß von NAD auf die Dissoziation

Die Aktivitätsänderung von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH wurde in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5 und 50 mM NaCl anhand von entnommenen Proben (—) verfolgt. An den durch Pfeil markierten Zeitpunkten wurden zusätzlich Proben

entnommen und auf eine Konzentration von 20 mM NAD gebracht. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsschritts wurde die Restaktivität dieser Proben weiter verfolgt (-----).

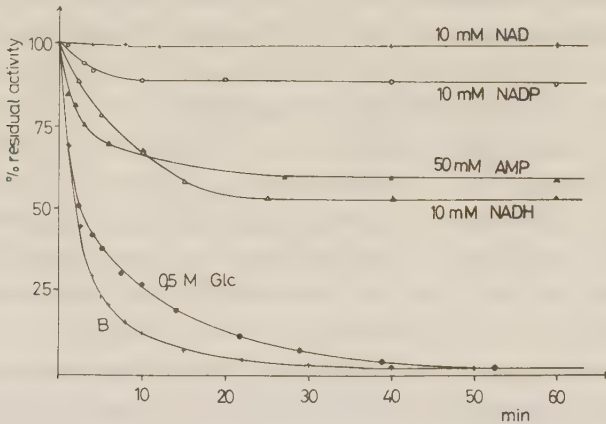


Abb. 30: Zeitabhängigkeit der Stabilisierung von GlucDH durch Coenzym und Coenzymteile

Inkubation von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 und 50 mM NaCl bei 25°C . Zusätzlich enthielt der Ansatz: (1) 10 mM NAD, (2) 10 mM NADP, (3) 50 mM AMP, (4) 10 mM NADH, (5) 0,5 M Glucose, (6) kein Zusatz.

Das Unvermögen der bisher untersuchten Dehydrogenasen, den Nicotinamidteil des Coenzym ohne vorherige Anlagerung der Adeninhälfte zu binden, kommt auch bei GlucDH zum Ausdruck. Verschiedene Autoren postulieren als Erklärung eine geordnete Reihenfolge für die Bildung des Enzym-Coenzym-Komplexes, wobei erst eine durch den AMP-Anteil induzierte Konformationsänderung die Bindungsregion für den NMN-Teil schafft (McPherson, 1970; Rossmann et al., 1975). Unterschiede im Verhalten der GlucDH zeigen sich jedoch darin, daß NMN auch in Gegenwart von AMP die Dissoziation kaum stärker hemmt als AMP allein, obwohl die Nicotinamidhälfte nach unseren Messungen ca. 60 Prozent der Bindungsenergie des gesamten Coenzym beiträgt. Außergewöhnlich am Bindungsverhalten der

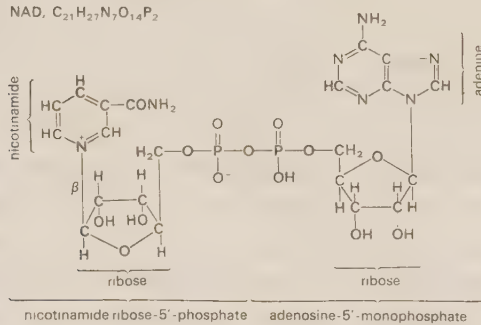
Tabelle 5: Dissoziationskonstanten von binären GlucDH-Ligand-Komplexen

Ligand	Dissoziations- konstante K_D M	Freie Bindungs- enthalpie ΔG kcal mol ⁻¹
NAD	$6,0 \cdot 10^{-4}$	-4,4
NADH	$7,1 \cdot 10^{-3}$	-2,93
NADP	$1,4 \cdot 10^{-3}$	-3,9
ADPR	$4,9 \cdot 10^{-3}$	-3,1
Adenosin	$4,4 \cdot 10^{-3}$	-3,2
Adenin	0,14	-1,2
AMP	$5,5 \cdot 10^{-2}$	-1,72
ADP	$5,2 \cdot 10^{-2}$	-1,75
NMN	-	-
AMP + NMN (1 + 1)	$4,4 \cdot 10^{-2}$	-1,85
GMP	0,22	-0,9
Inosin	-	-
Ribose-5'-Phosphat	$6,0 \cdot 10^{-2}$	-1,7
Ribose	1,0	-
Pyrophosphat	0,39	-0,56

GlucDH ist auch die herausragende Bedeutung, die dem Riboserest des Adenin-teils von NAD für die Bildung des Enzym-Ligand-Komplexes zukommt. Die nach ihrem Bindungsvermögen geordneten Teilmoleküle des Coenzym ergeben folgendes Bild:

Größenordnung der Dissoziationskonstanten

$10^{-1}M$	$10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$
Adenin	AMP	Adenosin	NAD
Pyrophosphat	ADP	ADPR	
Ribose	Ribose-5'-Phosphat	NADH	
		NADP	



Während von LDH Ribose-5'-Phosphat überhaupt nicht und Adenosin nur mäßig gebunden wird, liegt bei GlucDH die Bindungskonstante von Ribose-5'-Phosphat im Bereich derjenigen von AMP und ADP und die von Adenosin übertrifft sogar das Bindungsvermögen von NADH und ADPR. Erstaunlicherweise verringert die Vergrößerung des Adenosins um eine oder zwei Phosphatgruppen die Affinität gegenüber GlucDH und erst durch Hinzufügen des zweiten Riboserests wird beim ADPR wieder die Bindungsstärke von Adenosin erreicht. Dieses Ergebnis läßt sich am einfachsten durch die Konkurrenz von Anionen und dem Phosphatteil des Coenzym um dieselbe Bindungsstelle erklären. Messungen des Anioneneinflusses auf die Coenzymbindungsfähigkeit sollten diese These stützen oder entkräften können. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie sich

die identischen Wirkungen von Coenzym bzw. Coenzymteilen und Anionen auf die Dissoziation interpretieren lassen. Liegt beiden Effekten der gleiche Mechanismus zugrunde, ist die Ursache der Verhinderung der Dissoziation durch NAD oder Anionen in der Beeinflussung der den Phosphatteil des Coenzyms bindenden Region des aktiven Zentrums zu sehen. Als Alternative zu dieser Vorstellung ist die Herbeiführung einer kompakteren Struktur des Enzyms durch NAD und Ionen denkbar. Die Entscheidung, welches Modell vorzuziehen ist, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht getroffen werden. Durch chemische Veränderung der Coenzymbindungsregion und das Studium ihrer Auswirkungen auf die Dissoziation sollte dieses Problem jedoch zu lösen sein.

3. Die reversible Denaturierung von GlucDH

Die Frage, welche Prozesse die spontane Faltung einer neu synthetisierten oder denaturierten Polypeptidkette zu der spezifischen dreidimensionalen Konformation des nativen Proteins bewirken, hat seit den bahnbrechenden Experimenten von Anfinsen und Scheraga mit Ribonuclease Biochemiker immer stärker beschäftigt. Es wird heute allgemein anerkannt, daß die zur Faltung notwendigen Informationen in der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette und in den Umgebungsfaktoren (Lösungsmittel, pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) hinreichend festgelegt sind. In letzter Zeit ist darüber hinaus durch Deal (1969) sowie durch Alpers und Paulus (1971) die Beteiligung von spezifischen Liganden am Faltungsvorgang diskutiert worden. Die letztgenannten Autoren stellten die These auf, daß speziell bei oligomeren Enzymen die Umordnung einer zuerst entstehenden instabilen oligomeren Form zu einer stabilen "ausgereiften" Form als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Eiweißbiosynthese anzusehen sei. Diese normalerweise irreversible Konformationsänderung sei kinetisch kontrolliert durch spezifische Liganden. Alpers und Paulus sehen hierin einen neuen Typ von Regulationsmechanismus, den sie "preconditioning" nennen, und bei dem durch die jeweilige Ligandenkonzentration determiniert wird, ob ein Proteinmolekül zur biologisch aktiven Form ausreift oder proteolytischem Abbau anheimfällt. Speziell bei NAD-abhängigen Enzymen wird aufgrund des entscheidenden Einflusses, den das Coenzym auf die Reaktivierung verschiedener Dehydrogenasen ausübt (Bartholmes et al., 1973; Levi und Kaplan, 1971;

Levitzki und Tenenbaum, 1974), ein Preconditioning-Schritt postuliert. Wegen ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften erscheint GlucDH besonders geeignet, an ihrem Beispiel die These des Preconditioning von Dehydrogenasen zu überprüfen. Deshalb wurde in Analogie zu den Experimenten von Deal (1969) mit Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase die Denaturierung und Rückfaltung der GlucDH untersucht. In Abb. 31 ist der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Denaturierung von GlucDH in 8 M Harnstoff gezeigt. Weder NAD noch Glucose vermögen das Enzym gegen die Einwirkung von Harnstoff zu schützen. Dagegen ist die Inaktivierung nach Vorinkubation mit 1 M NaCl drastisch verlangsamt. Die Halbwertszeit der Inaktivierung vergrößert sich gegenüber dem Blindwert um den Faktor 500. ORD-Messungen ergaben, daß der völlig entfaltete Zustand in 8 M Harnstoff ohne NaCl-Zusatz in weniger als zwei Minuten erreicht wird. Dagegen waren nach Vorinkubation der GlucDH mit 1 M NaCl 30 Minuten nach der Harnstoffzugabe noch etwa 70 Prozent des Drehwerts des nativen Enzyms bei 233 nm zu beobachten. Der Unterschied zwischen Restdrehwert und Restaktivität, der in Abb. 31 zum Ausdruck kommt, wird durch die Reaktivierung der Proben im Aktivitätstest verursacht.

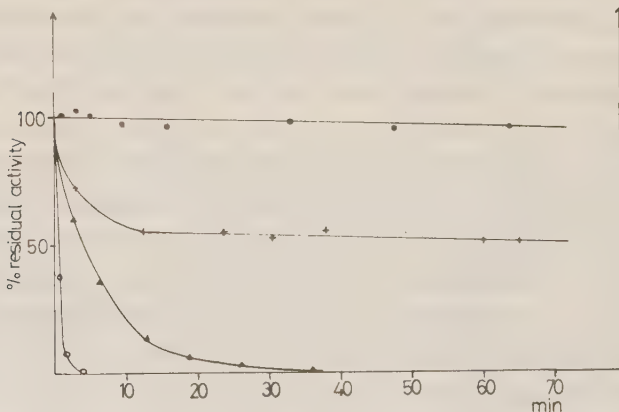


Abb. 31: Inaktivierung von $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH in 8 M Harnstoff und 50 mM EDTA

Zusätze zum Inaktivierungsansatz: (o—o) 1 M NaCl (Enzym 30 Minuten vor Harnstoffzusatz in 1 M NaCl vorinkubiert); (+ — +) 1 M NaCl (ohne Vorinkubation); () 0,5 M NaCl (ohne Vorinkubation); (o—o) 0,1 M NaCl, 20 mM NAD, 0,1 M Glucose (mit und ohne Vorinkubation).

Die Notwendigkeit einer Vorinkubationszeit läßt darauf schließen, daß Kochsalz eine Konformationsänderung induziert, die den Zutritt von Harnstoff zum Innern des Proteinmoleküls bzw. zwischen die Untereinheiten erschwert. Bereits bei der Messung der Fluoreszenzpolarisation war die Erhöhung der Starrheit der Proteinstruktur unter der Einwirkung von NaCl deutlich geworden. Die Konzentrationsabhängigkeit des Kochsalzeinflusses ist durchaus mit der Wirkung von NaCl auf die pH-induzierte Dissoziation vergleichbar. Da als erster Schritt der Harnstoffinaktivierung von oligomeren Proteinen die Dissoziation zu Untereinheiten angenommen wird, ist es möglich, daß der Einfluß von Kochsalz sowohl bei der Dissoziation als auch bei der Harnstoffinaktivierung auf einen identischen Mechanismus zurückgeführt werden kann. Die Renaturierungsversuche wurden mit GlucDH-Proben vorgenommen, die in Abwesenheit von NaCl länger als eine Stunde in 8 M Harnstoff bei 0°C inkubiert worden waren. Zwei Verfahren erwiesen sich als geeignet für die Reaktivierung dieser Proben. Das erste bestand in der Dialyse der Harnstofflösung gegen 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5, anschließendem Zusatz von Rinderserumalbumin zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml und weiterer Dialyse gegen 67 mM PP pH 6,5 und 1 M NaCl. Das Produkt des ersten Dialyseschritts weist bei der Messung der optischen Rotationsdispersion bereits den Drehwert des nativen Enzyms bei 233 nm auf. Es handelt sich dabei also um inaktive, aber bereits zurückgefaltete Untereinheiten. Nach der Reassoziations dieser Untereinheiten bei pH 6,5 konnten = 95 Prozent der ursprünglichen Aktivität zurückgewonnen werden. Auch die direkte Dialyse gegen Reassoziationspuffer ergab nach Zusatz von Rinderserumalbumin zur Probe ähnliche Reaktivierungsgrade. Im zweiten Verfahren wurde die Renaturierung der GlucDH durch Verdünnen der Harnstoffproben in Puffer erreicht. Wie von Deal (1969) beschrieben, wurden verdünnte Proben 10 Minuten bei 0°C vorinkubiert und dann bei höherer Temperatur weiterinkubiert. Das Temperaturoptimum für die Rückfaltung liegt im Bereich von 25°C. Ein interessanter Hinweis ergibt sich aus der Tatsache, daß bei höheren Temperaturen die anfängliche Reaktivierung größer ist als die einer bei 25°C inkubierten Probe, jedoch insgesamt eine geringere Reaktivierungsrate erzielt werden kann (Abb. 32). Dieser auch bei der Renaturierung von entfalteter Aldolase beobachtete Effekt ist im Auftreten

eines thermolabilen Zwischenzustandes - möglicherweise des monomeren Enzyms - begründet (Vimard et al., 1975). Die optimale Ionenstärke der Renaturierung der GlucDH ist 1-1,2 M NaCl, und auch bei dieser Methode ist ein Albuminzusatz von 0,5 mg/ml unerlässlich. Neben höheren Werten der optimalen Temperatur und Ionenstärke unterscheidet sich die Renaturierung von GlucDH von der der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase grundlegend hinsichtlich des Substrateinflusses. Während NAD bei Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase bereits in einer Konzentration von 1 mM das Fehlen von NaCl kompensieren kann, stimulieren weder NAD noch Glucose die Ausbildung der aktiven GlucDH-Konformation. Ein von der NAD-Konzentration gesteuerter Preconditioning-Schritt ist deshalb für GlucDH wenig wahrscheinlich.

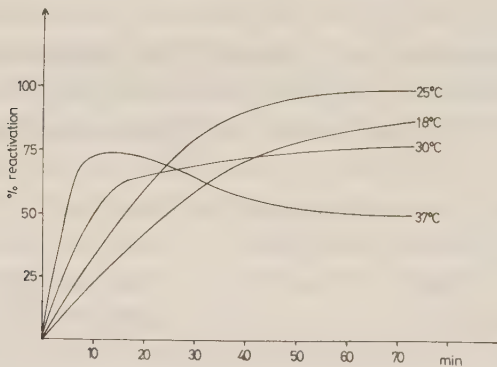
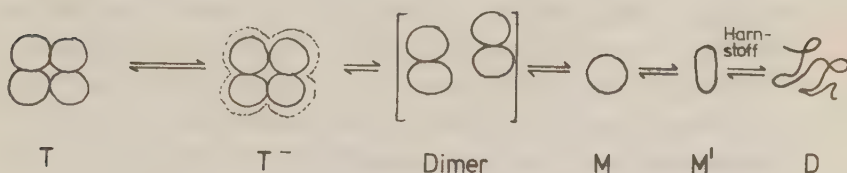


Abb. 32: Einfluß der Temperatur auf die Renaturierung von GlucDH durch Verdünnen in einer Lösung von 67 mM PP pH 6,5, 1 M NaCl und 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin. Die Konzentration des Enzyms nach der Verdünnung betrug $5,2 \cdot 10^{-7}$ M.

4. Diskussion und Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit geschilderten Resultate ermöglichen die Aufstellung eines vorläufigen Reaktionsschemas:



Bei geringer Ionenstärke oder hohen pH-Werten führt die aufgrund der geringen Ladungsabschirmung bzw. der höheren Nettoladung vergrößerte elektrostatische Abstoßung zwischen einzelnen Teilbereichen des Proteinmoleküls zu einer Auflockerung der Struktur, die sich in der schnellen Abnahme der Polarisation der intrinsischen Fluoreszenz bemerkbar macht. Diese Enzymform T^- , die noch volle enzymatische Aktivität besitzt, zerfällt in einer Weiterreaktion zu monomerer GlucDH M . Für eine dimere Zwischenstufe, die im obigen Schema vorgeschlagen wird, existieren bisher keine experimentellen Hinweise. Sowohl aus Röntgenstrukturdaten (Rossmann et al., 1975) als auch aus Hybridisierungsversuchen mit Isoenzymen (Levitzki und Tenenbaum, 1974) ist jedoch bekannt, daß die dimeren Form als untergeordnete Struktureinheit bei tetrameren Dehydrogenasen fungiert. Auch für die Reassoziaton ist die Beteiligung einer vielleicht kurzlebigen dimeren Zwischenstufe aus kinetischen Gründen vorauszusetzen. Neben einem allgemeinen Ladungseffekt, der zu T^- führt, ist für den Übergang $T^- \longrightarrow 4 M$ der Dissoziationsgrad eines einzigen Säure-Base-Paares pro Untereinheit der GlucDH bestimmend. Der pK-Wert dieses Aminosäureseitenrests entscheidet über die Deprotonierung an einem kritischen Punkt der Proteinstruktur. Das Verschwinden einer positiven Ladung von Imidazol-, α - oder ϵ -Aminogruppen schafft die Voraussetzung für den dann folgenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Dissoziation, der eine langsame Konformationsänderung und den damit verbundenen Verlust der enzymatischen Aktivität und der Quartärstruktur beinhaltet.

Die tetramere Form vermag abhängig vom pH-Wert eine bestimmte Zahl von Ionen zu binden, die während der Dissoziation freigesetzt werden. Die ausgeprägte Abhängigkeit von der Art des Salzes läßt vermuten, daß die Anionen und nicht die Kationen des Salzes definierte Bindungsstellen auf dem Tetrameren besetzen und auf diese Weise die Quartärstruktur stabilisieren. Die Bindung von Halogeniden und bivalenten Anionen ist bisher nur bei Proteinen in Lösungen mit niedrigem pH-Wert beobachtet worden, in denen das Makromolekül positiv geladen ist (Brandts, 1964; Scatchard und Yap, 1964). LDH bildet eine Ausnahme, da dieses Enzym auch im neutralen Bereich eine Chloridbindungsstelle besitzt, die ebenfalls Phosphat-, Sulfat- und Citrationen binden kann und im Untereinheitenbindungsbereich lokalisiert ist (Adams et al., 1973; Ward, 1975). Die Beeinflussung des Gleichgewichts und Reaktionsgeschwindigkeit der Dissoziation von GlucDH durch geringe Konzentrationen von bestimmten Neutralsalzen ist analog zu den Beobachtungen an LDH zu deuten. Anionen, die bestimmte positiv geladene Bereiche des Enzyms besetzen, verhindern entweder die Deprotonierung des oben erwähnten kritischen Aminosäurerests durch Beeinflussung des pK-Werts oder sie kompensieren die durch die Deprotonierung erhöhte elektrostatische Abstoßung in diesem Teil des Moleküls durch die Aufrechterhaltung einer Ionenpaarbindung. Die letztgenannte Möglichkeit ist vorzuziehen, da Jodid als Halogenid mit der größten Polarisierbarkeit das Tetramer am deutlichsten stabilisiert.

Die Auswirkungen der spezifischen Bindung von Gegenionen sind äußerst schwierig zu trennen von den reinen Ionenstärkeeffekten, die bei höheren Salzkonzentrationen hinzukommen. Hohe Ionenstärken stabilisieren in den pH-Bereichen, in denen die Nettoladung eines Proteins hoch ist, durch die Reduzierung der gegenseitigen Abstoßung von Oberflächenladungen. Gleichzeitig erniedrigen Neutralsalze die Aktivität von Protonen und geladenen Molekülen und erhöhen somit den Dissoziationsgrad von ionisierbaren Gruppen auf der Proteinoberfläche (von Hippel und Schleich, 1969). Die stabilisierende Wirkung übertrifft im Fall der GlucDH die letztgenannten Auswirkungen hoher Ionenstärken. Die Messung der Fluoreszenzpolarisation und die Titration des Enzyms mit 1.8 ANS zeigen eine ausgeprägte Zunahme der Kompaktheit

des Enzymmoleküls und die Kompensierung der erhöhten Abstoßung bei pH 9 in Gegenwart hoher Kochsalzkonzentrationen. Auch die Hemmung der Inaktivierung des Enzyms in 8 M Harnstoff kann auf diesen Mechanismus zurückgeführt werden, der den für die Auffaltung der Polypeptidkette notwendigen Zutritt von Harnstoff ins Innere des Enzymmoleküls verhindert. Die besondere Stabilität von GlucDH in Gegenwart von Halogeniden in Konzentrationen, die bei anderen Dehydrogenasen Dissoziation und Auffaltung induzieren, muß deshalb auf die Anzahl und die Anordnung der Oberflächenladungen und auf ihre Fähigkeit zur Abschirmung durch Gegenionenwolken zurückgeführt werden. Diese Eigenschaften gewährleisten, daß der native Zustand selbst bei einer Beeinträchtigung der Umgebung durch chaotrope Ionen und Harnstoff erhalten bleibt.

Das erste Produkt der Dissoziation ist die inaktive, jedoch nach den Kriterien der optischen Rotationsdispersion und der Reaktion mit spezifischen Antikörpern unveränderte Untereinheit der GlucDH. Das Monomer M entspricht der Form, die bei der Säuredissoziation von LDH erzeugt wird, jedoch nur 1 Minute stabil ist, bevor eine Weiterreaktion zu einem modifizierten Monomeren M' stattfindet (Vallee und Williams, 1975). Eine entsprechende Form M' ist im Reaktionsschema ebenfalls für GlucDH postuliert, da aus verschiedenen Gründen eine äußerst langsame Umwandlung der zuerst entstehenden Untereinheiten M anzunehmen ist. Das wesentlich instabilere Primärprodukt der Dissoziation der LDH ist analog zur monomeren GlucDH M vollständig durch die Rückstellung auf neutrale Bedingungen reaktivierbar (Levitzki und Tenenbaum, 1974; Anderson und Weber, 1966). Die Vorteile des GlucDH-Systems sind also darin zu sehen, daß der Zustand M über Stunden stabil ist und die Umwandlung des nativen Enzyms zu M vollständig abgeschlossen ist, bevor signifikante Mengen an M' auftreten. Darüber hinaus ist die Reaktion $M \rightarrow M'$ im Gegensatz zur LDH vollständig reversibel und stellt, wie im Schema gezeigt, wahrscheinlich einen Zwischenzustand der Rückfaltung der völlig entfalteten Polypeptidkette dar. Die Existenz solcher definierter Faltungszwischenprodukte ist zumindest für Staphylococcus Nuclease, die aus einer einzigen Polypeptidkette besteht, vor kurzem nachgewiesen worden (Anfinsen und Scheraga, 1975).

Weiterhin muß betont werden, daß alle bis jetzt untersuchten Eigenschaften der renaturierten bzw. reassozierten GlucDH identisch sind mit dem unbehandelten nativen Enzym. In vielen Fällen konnte zwar nach der Dissoziation oder Denaturierung von Enzymen die Enzymaktivität wiederhergestellt werden, aber verschiedene Eigenschaften blieben auch nach der Reaktivierung verändert (Levi und Kaplan, 1971; Teipel und Koshland, 1971).

Die Bindung von NAD bzw. von Coenzymteilmolekülen an GlucDH ist nur bedingt mit der Bindung von Ionen vergleichbar. NAD ist relativ groß und besetzt eine hochspezifische Bindungsstelle im aktiven Zentrum. Dennoch besteht eine Analogie zwischen der Beeinflussung der Dissoziation durch Ionen und durch das Coenzym. Die Bildung des binären Enzym-NAD-Komplexes bzw. des Komplexes zwischen GlucDH und Molekülfragmenten des AMP-Teils von NAD inhibiert vollständig den Zerfall zu Untereinheiten. Es ist bekannt, daß die Bindung des Coenzym die Zahl der austauschbaren Protonen in Dehydrogenasen vermindert (DiSabato und Ottersen, 1965). Sowohl die Herbeiführung einer kompakteren Struktur als auch die Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit von Aminosäureresten im aktiven Zentrum können für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden. Die Konformationsänderungen der GlucDH während der Dissoziation finden im Coenzymbindungsregion und in den Untereinheitenkontaktregionen statt. Es ist deshalb anzunehmen, daß der AMP-Teil des Coenzym vornehmlich diese lokalen Veränderungen verhindert und die Auswirkung auf die Gesamtstruktur von untergeordneter Bedeutung ist. Dies mag eine Begründung dafür sein, daß NAD keine Reassoziierung bewirken kann, während hohe Ionenstärken zu einer vollständigen Reaktivierung des Enzym bei pH 9 führen. In gleicher Weise kann die unterschiedliche Schutzwirkung von NaCl und NAD bei der Harnstoffinaktivierung erklärt werden.

Wie schon früher diskutiert, ist es möglich, daß die Bindungsstellen des Enzym für spezifische Anionen, die während der Dissoziation freigesetzt werden, ebenfalls in der Coenzymbindungsregion lokalisiert sind. Die Tatsache, daß die enzymatische Aktivität eine ausgeprägte Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aufweist (Pauly, 1974), kann als ein erster Hinweis auf eine Konkurrenz von Anionen und NAD um die gleiche Bindungsstelle gewertet werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß das NADP, das eine zusätzliche Phosphatgruppe an der 2'-OH-Gruppe der Ribose des Adeninteils trägt und ebenfalls als Coenzym aktiv ist, erst bei höheren NaCl-Konzentrationen deutlich schlechter als NAD gebunden wird. Die Untersuchung der Anionenbindungsfähigkeit der GlucDH in Gegenwart und Abwesenheit von NAD mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse sowie die Untersuchung der Quenchung der NADH-Fluoreszenz durch Jodid sollten dieses Problem endgültig klären können.

Die exakte zeitliche Kongruenz der Aktivitätsänderung und der Abnahme der Coenzymbindungsfähigkeit mit der Änderung der Tryptophanabsorption, die als Indikator für die Lösungsmittelzugänglichkeit der Untereinheitenbindungsregion anzusehen ist, kann nur durch eine direkte Wechselwirkung zwischen dieser Region und dem aktiven Zentrum erklärt werden. Das aktive Zentrum muß mit den Substraten reagieren können. Es besitzt daher eine relativ offene Struktur, die lösungsmittelzugänglich ist und in der zahlreiche durch ihre Umgebung aktivierte Aminosäurereste angeordnet sind. Die Auslösung der Dissoziation durch die Deprotonierung eines Aminosäurerests in der Coenzymbindungsregion ist deshalb eine einleuchtende Hypothese. Unterstützung erfährt sie dadurch, daß die Verhinderung der Dissoziation primär durch die Reaktion von NAD und wahrscheinlich auch von Anionen mit dieser Region erreicht wird. Wie das Beispiel der in der Einleitung angesprochenen regulatorischen Enzyme zeigt, können die durch die Bindung oder Abgabe von Liganden erzeugten Kräfte auf entfernte Bereiche eines Proteinmoleküls übertragen werden. Sie werden dort die größte Wirkung zeigen, wo die für die Aufrechterhaltung der nativen Konformation verantwortlichen Bindungen am schwächsten sind. Solche Regionen sind die Grenzflächen zwischen Untereinheiten und die Grenzflächen zwischen in sich abgeschlossenen Strukturdomänen innerhalb von Untereinheiten. Für zahlreiche Enzyme und speziell für Dehydrogenasen wurde die Existenz solcher Substrukturen nachgewiesen (Wetlaufer, 1973; Rossmann et al., 1975). Aus den bisher vorliegenden Daten ist zu entnehmen, daß Dehydrogenasen aus zwei Hälften bestehen, einer NAD-Bindungsregion, die sich aus einem NMN- und einem AMP-bindenden Unterbereich aufbaut und die sich während der Evolution nahezu unverändert

erhalten hat, und einer katalytischen Region, die die spezielle Funktion der jeweiligen Dehydrogenase ermöglicht. Das Auftreten von zwei Abschnitten unterschiedlicher Funktion innerhalb einer Polypeptidkette wird auf eine Genfusion zurückgeführt (Rossmann et al., 1975).

Sieht man diese Arbeit im Zusammenhang mit den generellen Erkenntnissen über Dehydrogenasen, läßt sich daraus ein Denkmodell ableiten, das die beste Integration der bis jetzt gesicherten Daten über GlucDH ermöglicht. Die Dissoziation und die Inaktivierung von GlucDH kann danach als Konsequenz des Auseinander- oder Zusammendriftens der unveränderten Strukturdomänen innerhalb einer Untereinheit gesehen werden. Die unveränderte optische Rotationsdispersion und die immunologische Identität des monomeren und tetrameren Enzyms sowie die oben diskutierten Mechanismen der Hemmung bzw. Auflösung dieser Konformationsänderungen finden damit eine vorerst befriedigende Erklärung. Die in jüngster Zeit in zunehmendem Maße verfügbaren Informationen über die Sequenz von Dehydrogenasen und über die dreidimensionale Struktur ihrer Kristalle haben zu einer Vervollständigung des statischen Bildes von Dehydrogenasen geführt. Ich hoffe, daß es mit dem in vieler Hinsicht idealen GlucDH-System möglich sein wird, auch die Dynamik der intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Untereinheiten in Dehydrogenasen näher zu untersuchen, wobei die Bedeutung solcher Konformationsänderungen für die Mechanismen der enzymatischen Katalyse noch nicht zu überblicken ist. Ein Erfolg auf diesem Gebiet ist abhängig von der Entwicklung noch empfindlicherer Untersuchungsmethoden, wobei der Fluoreszenzspektroskopie eine wichtige Rolle zufallen dürfte.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Vorgereinigtes Ausgangsmaterial für die Gewinnung von GlucDH wurde uns freundlicherweise von Dr. H. Lang, Biochemische Forschung der E. Merck AG, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. Der Mikroorganismus, seine Kultivierung und die Anreicherung von GlucDH sind kürzlich beschrieben worden (Banauch et al., 1975). Aufgrund der Verwendung der Mutante *Bacillus megaterium* M 1286 und eines geträgerten Aufbereitungsverfahrens weist dieses Ausgangsmaterial eine höhere spezifische Aktivität (41 U/mg) auf als die früher verwendete Charge HS 210. Durch den Verzicht auf einen Hitzedenaturierungsschritt enthält das jetzt verwendete Material Anteile (< 10 %) einer thermolabilen GlucDH-Form, deren Reaktivierung aus dem entfalteten oder dissoziierten Zustand nicht gelingt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Reaktivierungsversuche wurden deshalb mit aus der Charge HS 210 gewonnenem Reinezym durchgeführt, wenn die quantitative Rückgewinnung der Enzymaktivität gewährleistet sein sollte.

Bezugsquellennachweis für Enzyme und Reagentien

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

NAD, NADH, NADP, LDH (Schweineherz), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Hefe).

E. Merck AG, Darmstadt:

Sämtliche Coenzymanalogen, Reagentien für die Disk-Elektrophorese und alle nicht ausdrücklich genannten Laborreagentien.

SERVA Feinbiochemica, Heidelberg:

Servalyte und Referenzsubstanzen für die Isoelektrische Fokussierung und die Molekulargewichtsbestimmungen, MTT, TEMED, Phenazinmethosulfat, Coomassie Brilliant Blue R 250, 1-Anilinonaphthalin-8-sulfonat.

Behringwerke AG, Marburg:

Rinderserumalbumin

Koch-Light-Laboratories Ltd, Colnbrook/Großbritannien:

Menschliches Hämoglobin.

2. Methoden

2.1. Isolierung der GlucDH

Stammpuffer für alle Chromatographieschritte: 67 mM PP pH 6,5 mit 0,4 M NaCl und 0,01 % NaN_3 .

Ausgangsmaterial (2 g) wurde in 100 ml vierfach verdünntem Stammpuffer gelöst, 20 Minuten in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand auf eine Sephadex QAE-A50 Anionenaustauschsäule (3 x 50 cm) aufgetragen, die mit 1 : 2 verdünntem Stammpuffer äquilibriert worden war. Nach dem Waschen wurde ein linearer Gradient aus 1 : 2 verdünntem und unverdünntem Stammpuffer mit einem Gesamtvolumen von 600 ml angelegt. GlucDH-Aktivität wurde in einem isolierten Peak erhalten. Dieses Eluat wurde direkt auf eine mit 1 : 2 verdünntem Stammpuffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule (2,5 x 40 cm) aufgetragen und nach dem Waschen ein NaH_2PO_4 -Gradient von 33 bis 200 mM NaH_2PO_4 pH 6,5 mit einem Gesamtvolumen von 500 ml angelegt. Das für diesen Reinigungsschritt benötigte Hydroxylapatit wurde nach der Vorschrift von Bernardi (1971) stets frisch hergestellt. Fraktionen mit mehr als 30 U/ml wurden gesammelt und mittels Ultrafiltration (Schleicher & Schüll, Dassel) konzentriert, auf eine Konzentration von 3 M NaCl gebracht und in dieser Form im Kühlschrank gelagert.

2.2.

Die Einzelheiten der Durchführung des Aktivitätstests, der Proteinbestimmung, der Disk-Elektrophorese, der Isoelektrischen Fokussierung und der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung sowie der Gelfiltration, der Dichtegradientenzentrifugation und der Fluoreszenztitration der NADH-Bindungsstellen sind kürzlich beschrieben worden (Pauly und Pfeleiderer, 1975).

Der überwiegende Teil der Bestimmungen der Aktivität im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Reaktionskinetik, zum pH- und Ioneneinfluß etc. erfolgte, abweichend vom oben beschriebenen Test, mit Hilfe eines Gilford 300 N-Spektralphotometers mit Durchflußküvette und Zusatz für schnelle Probennahme. Diese Meßeinrichtung erlaubt die Verfolgung der Aktivität in weniger als 5 Sekunden nach dem Start der Reaktion und in Intervallen

von 30 Sekunden pro Einzeltest. Dadurch konnten Verfälschungen der Meßergebnisse durch langsame Reaktivierungsvorgänge im Test vermieden und genaue Bestimmungen der Reaktionskonstanten auch bei schnellen Aktivitätsänderungen vorgenommen werden.

Die Durchführung der Dünnschichtgelchromatographie erfolgte in einer von Jaworek (1969) beschriebenen Apparatur auf sorgfältig gereinigten Glasplatten (20 x 20 cm) mit einer 6-8 mm Gelschicht aus Sephadex G-200 superfine. Die Trennschicht wurde durch Verstreichen des vorgequollenen Gels mit Hilfe von Glasstäben aufgetragen, die mit Abstandhalter in der gewünschten Gelschichtdicke versehen waren. Nach fünfzehnminütigem Antrocknen der Schicht in der waagrecht einjustierten Laufkammer wurde 1 Stunde bei einer Steigung von 15° äquilibriert. Als Pufferbrücken dienten doppelte Lagen von Chromatographiepapier der Fa. Machery & Nagel bzw. Whatman-Papier Nr. 3. Proben (5 bzw. 10 μ l) wurden bei waagerechter Stellung der Platte mit einer Eppendorf-Pipette mit 1,5 cm Mindestabstand voneinander auf der Startlinie aufgetragen. Durch 1,2 mm dicke Kunststoffrandstreifen und eine zweite Glasplatte wurde die Trennschicht in einer Art "Sandwich-Packung" abgedichtet, um Verdunstungsvorgänge an der Geloberfläche zu verringern. Mit Hilfe dieser Anordnung und einer Steilheit der Platte von 25° war das Ende einer Trennung, d.h. die Ankunft von Dextranblau am unteren Plattenrand, in der Regel nach 1,5 Stunden erreicht. Die Nachweisgrenze für die enzymespezifische Anfärbung mittels Papierabklatsch betrug 0,25 μ g GlucDH pro Startfleck. Der Proteinachweis mit diazotierter Sulfanilsäure erforderte mindestens 20 μ g pro Startfleck.

3. Konformationsuntersuchungen

Messungen der optischen Rotationsdispersion wurden mit Hilfe eines registrierenden Cary 60 Spektralpolarimeters der Applied Physics Corporation, Monrovia, Kalifornien, aufgenommen. Der Lichtweg der Küvette betrug bei allen Messungen 1 cm. Wie auch bei der UV-Differenzspektroskopie und den Fluoreszenzmessungen, wurden alle Lösungen durch Millipore-Filtration von Flusen befreit. Die differenzspektroskopischen Messungen wurden bei 25°C am Beckman Model 25

Spektralphotometer in Tandemküvetten QS 278 der Fa. Hellma, Müllheim, durchgeführt. Relativ zu nativer GlucDH (0,45 mg/ml) in 33 mM PP pH 6,5 und 0,2 M NaCl wurde das Spektrum einer identischen Menge GlucDH nach dreißigminütiger Inkubation in 0,1 M Gly-Tris-Puffer pH 9 im Bereich von 240-320 nm bzw. die Änderung der Absorption bei 292 nm in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei pH 9 aufgenommen. Die Änderung der enzymatischen Aktivität wurde bei diesen Versuchen parallel dazu durch Probenahme in Intervallen von 30 Sekunden verfolgt. Fluoreszenzmessungen wurden am Fluoreszenzspektralphotometer MPF 44 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen, unter Verwendung des Polarisationszusatzes Hitachi 018-0054 und eines mit Vorverstärker ausgerüsteten Philipps-Schreibers 8202 bei 25°C durchgeführt. Messungen der Fluoreszenzpolarisation erfolgten mit korrigierter Intensität der Anregungsstrahlung und einer Anregungsbandweite von 0,5 nm und einer Bandweite von 20 nm am Emissionsmonochromator. Die Berechnung der Polarisation erfolgte nach der Beziehung

$$P = \frac{I_{HH} - I_{HV}}{I_{HH} + I_{HV}}$$

I = Intensität der Fluoreszenz

Die Indizes H = horizontal und V = vertikal beziehen sich auf die Stellung der Polarisationsfilter, wobei die erste Angabe die Stellung des Filters im Anregungsstrahl und die zweite die Stellung des Filters im Emissionsstrahl bezeichnet. Beiträge der Pufferlösungen zur Polarisation wurden berücksichtigt, während die Beiträge zur Fluoreszenzintensität von 1.8 ANS bei der Titration monomerer und nativer GlucDH vernachlässigbar waren. Diese Titrationen wurden in Analogie zu den beschriebenen NADH-Titrationen durchgeführt. Die Auswertung der Polarisationsmessungen und der Fluoreszenztitrationen erfolgte am Tischcomputer Wang 2200 mit Programmen, die freundlicherweise von Herrn P. Tuengler und Dr. W. Trommer (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt wurden. Immunologische Untersuchungen wurden mit Hilfe eines gegen tetramere GlucDH aus Kaninchen gewonnenen Antiserums durchgeführt. Zur Immunisierung erhielt das Tier eine Primärinjektion von 1 mg reiner GlucDH

in Emulsion mit kompletten Freundschens Adjuvans in die Fußballen eines der beiden Hinterläufe (intraplantar) sowie an mehreren Stellen des Rückens in die Haut (intradermal). Eine zweite intravenöse Injektion der gleichen Dosis erfolgte 4 Wochen danach in die Ohrtrandvene. 7 Tage später wurde dem Tier 40 ml Blut entnommen. Für die einfache radiale Immundiffusion nach Mancini et al. (1964) wurde Agarosegel (0,8 %) in 33 mM PP pH 6,5 und 0,2 M NaCl bzw. in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 9 und 0,1 M NaCl verflüssigt, bei 50°C thermostatisiert, mit dem Antiserum bzw. bei der umgekehrten Technik mit dem Antigen gemischt und auf Glasplatten (5 x 5 cm) ausgegossen (4 ml Gel/25 cm²). Nach dem Einfüllen der jeweiligen Lösungen in die Depots (je 8 µl bei einem Lochdurchmesser von 3 mm) erfolgte die Diffusion bei Zimmertemperatur 2 Tage in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde 2 weitere Tage in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, dann enzyspezifisch angefärbt und getrocknet. Die Doppeldiffusionsexperimente nach Ouchterlony (1962) wurden analog dazu ausgeführt.

4. Dissoziation von GlucDH

Monomere GlucDH wurde in der Regel durch Verdünnen und dreißigminütige Inkubation des gegen 33 mM PP pH 6,5 und 0,1 M NaCl dialysierten Reinzynzyms in 50 mM Glycinlösung hergestellt, die durch Zugabe von festem Tris auf pH 9,0 eingestellt worden war. Die Konzentration des Enzyms im Inkubationsansatz lag im Bereich von 0,5 bis 200 µg/ml. Der Einfluß der geringen Mengen an Phosphat und NaCl wurde vernachlässigt.

Reassoziaton der GlucDH

Die Reassoziaton und Reaktivierung erfolgte durch direkte Zugabe von Reassoziationspuffer zu Lösungen dissoziierter GlucDH. Die Endkonzentrationen im Reaktivierungsansatz waren: GlucDH 50 µg/ml; NaCl 1 M; PP pH 6,5 0,25 M; EDTA 10 mM; Rinderserumalbumin 0,5 mg/ml. Vollständige Reaktivierung war in der Regel nach 45 - 60 Minuten zu beobachten. Bei Proben, in denen der Zusatz von Rinderserumalbumin unerwünscht war, z.B. für spektroskopische Untersuchungen, wurde die Reaktivierung in Abwesenheit von Rinderserumalbumin durchgeführt und die Vollständigkeit der Reaktivierung

durch anschließende Konzentrierung der Proben auf 0,5-1 mg/ml GlucDH erreicht. Alle Experimente zur Ermittlung des Dissoziationsgleichgewichts von GlucDH und des Einflusses von pH-Wert, Ionen und Temperatur auf die Geschwindigkeit und das Gleichgewicht wurden, falls nicht anders im Text vermerkt, mit einer Enzymkonzentration von 62,5 µg/ml GlucDH, entsprechend $5,2 \cdot 10^{-7}$ M GlucDH-Tetramer, ausgeführt.

5. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von binären GlucDH-Ligand-Komplexen aus der Hemmung der Dissoziation von GlucDH

$2,2 \cdot 10^{-6}$ M GlucDH-Monomer wurden in Anwesenheit verschiedener Ligandenkonzentrationen X in 50 mM Gly-Tris Puffer pH 8,5 und 50 mM NaCl inkubiert und die Restaktivität nach 30, 45 und 60 Minuten bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter der Annahme, daß die Restaktivität dem Anteil der als Enzym-Ligand-Komplex vorliegenden GlucDH proportional sei:

$$\% \text{ Restaktivität (RA)} = \frac{[EX]}{[E]_0} \times 100$$

Für das Dissoziationsgleichgewicht dieses Komplexes gilt:

$$\frac{[E]_f [X]_f}{[EX]} = K_D$$

Konzentration des freien Enzyms $[E]_f = [E]_0 - [EX]$

Konzentration des ungebundenen Liganden $[X]_f = [X]_0 - [EX]$

Daraus folgt:

$$K_D = \frac{100 - \% \text{ RA}}{\% \text{ RA}} \times \left\{ [X]_0 - \frac{\% \text{ RA}}{100} [E]_0 \right\}$$

Die Berechnung wurde mit einem freundlicherweise von Dr. Trommer zur Verfügung gestellten Rechenprogramm am Computer Wang 2200 mit angeschlossenem Plotter durchgeführt. Hierbei handelte es sich um ein Programm zur iterativen Anpassung der Meßwerte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate an die theoretische Bindungskurve unter Variation der Zahl der Bindungsstellen, der Dissoziationskonstanten und des Endwerts. Dieses Programm wurde auch zur Berechnung der NADH- und 1.8 ANS-Titrationskurven benutzt.

Verwendete Abkürzungen

G lucDH	G lucosedehydrogenase
LDH	Lactatdehydrogenase
NAD	Nicotin amidadenindinucleotid, oxydiert
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintripphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
ADPR	Adenosindiphosphatribosid
NMN	Nicotinamidmononucleotid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Äthylendinitri lotetraessigsäure
Gly	Glycin
PP	NaH_2PO_4 /NaOH Puffer
1.8 ANS	1-Anilidonaphthalin-8-sulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
IP	Isoelektrischer Punkt

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.J., Liljas, A., Rossmann, M.G. (1973) *J. Mol. Biol.* 76, 519-531
- Anderson, S. & Weber, G. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 207-223
- Anfinsen, C.B. (1966) *Harvey Lect.* 61, 95
- Anfinsen, C.B. (1973) *Science* 181, 223
- Anfinsen, C.B. & Scheraga, H.A. (1975) *Adv. Prot. Chem.* 29, 205
- Bach, J.D. (1963) *Diss. Abstr. Bact.* 2221
- Banauch, D., Brümmer, W., Ebeling, W., Metz, H., Rindfrey, G., Lang, H., Leybold, K. & Rick, W. (1975) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 3, 101-107
- Bartholmes, P., Durchschlag, H. & Jaenicke, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 39, 101-108
- Bernardi, G. (1971) in *Meth. Enzymol.* (Jakoby, W.E., ed.), vol. XXII, p. 325-338 *Academ. Press*, New York
- Brandts, J.F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4291
- Cleland, W.W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137
- Cohn, E.J. & Edsall, J. T. (1943) *Proteins, Amino Acids and Peptides*, p. 445, *Reinhold Publ.*, New York
- Cole, T.A. & Brooks, T.W. (1968) *Science* 161, 386
- Deal, W.C. (1969) *Biochem.* 8, 2795-2805
- DiSabato, G. & Ottersen, M. (1965) *Biochem.* 4, 422
- Ewe, T., Pauly, H.E., Pfeleiderer, G. (1976), in Vorbereitung
- French, T.C. & Hammes, G.G. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3240
- Jaenicke, R. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 149-155
- Jaworek, D. (1969) *Chromatographia* 2, 289-292

- Jeckel, D., Anders, R., Pfeleiderer, G. (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 769
- Hanes, C.S. (1932) Biochem. J. 26, 1406
- Hartmann, B.K. & Udenfried, S. (1969) Anal. Biochem. 30, 391-394
- Hedrick, J.L. & Smith, A.J. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164
- von Hippel, P.H. & Schleich, T. (1969) in Structure and Stability of Biological Macromolecules, vol. 2 (Timasheff, S.N. & Fasman, G.D., eds.) chapter 6, Dekker, New York
- Hofmeister, F. (1888) Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 24, 247
- Houston, L.L. (1971) Anal. Biochem. 44, 81-88
- Kauzmann, W. (1954) Adv. Prot. Chem. 14, 1
- Kools, J.W. (1964) Diss. Abstr. Bact. 2175
- Levi, A.S. & Kaplan, N.O. (1971) J. Biol.Chem. 246, 6409-6417
- Levitzki, A. & Tenenbaum, H. (1974) Isr. J. Chem. 12, 327-337
- Lumry, R. & Biltonen, R. (1969) in Structure and Stability of Biological Macromolecules, vol. 2 (Timasheff, S.N. & Fasman, G.D., eds) p. 62, Dekker, New York
- Mancini, G., Vaerman, J.P., Carbonara, A.O. & Heremans, J.F. (1964) in Proc. XIth Colloquium Protides of the Biological Fluids (H. Peeters, ed.) Elsevier, Amsterdam
- Martin, R.G. & Ames, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379
- McKay, R.H. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 135, 218-230
- McPherson, J. (1970) J. Mol. Biol. 51, 39-46
- Michaelis, L. (1931) Biochem. Z. 234, 139-144
- Millar, D.B. (1974) Biochim. Biophys. Acta 359, 152-176
- Mommaerts, W.F.H.M. (1968) in Meth. Enzymol., vol. XII B (Grossmann, L. & Moldave, K., ed.) p. 302, Acedemic Press, New York

- Ouchterlony, Ö. (1962) *Progr. Allergy* 6, 30
- Paulus, H. & Alpers, J.B. (1971) *Enzyme* 12, 385-401
- Pauly, H.E. (1974) Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Pauly, H.E. & Pfeleiderer, G. (1975) *Z. Physiol. Chem.* 356, 1613-1623
- Rossmann, M.G., Liljas, A. Branden, C.J., Banaszak, L.J. (1975) in *Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) vol. XI, p. 62-103, Academ. Press, New York
- Sadoff, H.L., Bach, J.A. & Kools, J.W. (1965) in *Spores III* (Halvorson, H., ed.) p. 97-110, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Michigan
- Sawyer, H.W. & Puckridge, J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 8429-8433
- Scatchard, G. & Yap, W. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 3434
- Simmons, N.S., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A.G., Wetlaufer, D.B. & Blout, E.R. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 4766
- Strickland, E., Billups, C. & Kay, E. (1972) *Biochem.* 11, 3657-3662
- Sund, H. (1968) in *Biological Oxidations* (Singer, T.P., ed.) p. 641-705, Intersci. Publ., New York
- Tanford, C. (1961) *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York
- Teipel, J.W. & Koshland, D.E. (1971) *Biochem.* 10, 792-797
- Vallee, R.B. & Williams, R.C. (1975) *Biochem.* 14, 2574-2580
- Vimard, C., Orsini, G. & Goldberg, M.E. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 521-527
- Ward, R.L. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 22-28
- Weber, G. (1970) in *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (Hercules, D.M., ed.) Wiley, New York
- Wenzel, H. & Trommer, W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, in Vorbereitung
- Wetlaufer, D.B. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70, 697
- Yanari, S. & Bovey, F.A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2818

Wetlaufer, D.B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 697

Yanari, S. & Bovey, F.A. (1960) J. Biol. Chem. 235, 2818

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer am Lehrstuhl Biochemie der Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität Bochum begonnen und am Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart fortgesetzt.

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer danke ich sehr herzlich für seine vielfältige Unterstützung und sein reges Interesse, die mir vor allem in schwierigen Phasen der Arbeit eine große Hilfe waren.

Allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Herrn Dr. H.H. Kiltz und Herrn Dr. D. Jeckel, danke ich für die Einführung in neue Arbeitstechniken und klärende Diskussionen.

Herrn D. Thiel schulde ich Dank für seine hervorragende technische Hilfe bei der Durchführung der kinetischen Messungen.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter der Biochemischen Forschung der Fa. E. Merck, Darmstadt, Herrn Dr. H. Lang, für die Überlassung des Enzymrohprodukts.

Lebenslauf

7.10.1948	geboren in Berresheim/Rheinland-Pfalz
1955 - 1959	Volksschule Allenz
1959 - 1960	Staatliches Gymnasium Mayen
1960 - 1967	Carl-Humann-Gymnasium Essen-Steele
1967	Abitur
1967 - 1969	Grundwehrdienst
Ab SS 1969	Studium der Chemie und Physik an der Technischen Universität Clausthal-Zellerfeld
1971	Diplomchemiker-Vorexamen
Ab SS 1971	Studium der Chemie an der Universität Dortmund
6.08.1971	Eheschließung mit der Studentin der Pädagogik Barbara Siggemann
Ab WS 1972/73	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
1973	Diplomchemiker-Hauptexamen, mündliche Prüfung
März 1973 - Januar 1974	Diplomarbeit "Charakterisierung von Glucose-dehydrogenase", durchgeführt unter der Leitung von Professor Dr. G. Pfeleiderer am Lehrstuhl Biochemie der Ruhr-Universität Bochum
Februar 1974	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl Biochemie der Ruhr-Universität Bochum
Juli 1975	Umzug nach Leonberg/Württ.; Fortsetzung der Dissertation unter Anleitung von Professor Dr. G. Pfeleiderer am Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart
6.02.1976	Geburt des Sohnes Oliver Johannes

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Arbeit allein und nur unter Anwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

